

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**CARACTERIZACIÓN DE LA
SEÑALIZACIÓN *INSIDE-OUT*
IMPLICADA EN LA REGULACIÓN DE LA
ADHESIÓN DE LINFOCITOS T DEPENDIENTE
DE LA INTEGRINA VLA-4**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

M Soledad Isern de Val

Bajo la dirección del Doctor

Joaquín Teixidó Calvo

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I

**CARACTERIZACIÓN DE LA
SEÑALIZACIÓN *INSIDE-OUT*
IMPLICADA EN LA REGULACIÓN DE LA
ADHESIÓN DE LINFOCITOS T DEPENDIENTE
DE LA INTEGRINA VLA-4**

**M Soledad Isern de Val
2016**

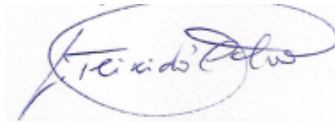
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I

**CARACTERIZACIÓN DE LA
SEÑALIZACIÓN *INSIDE-OUT*
IMPLICADA EN LA REGULACIÓN DE LA
ADHESIÓN DE LINFOCITOS T DEPENDIENTE
DE LA INTEGRINA VLA-4**

Este trabajo ha sido realizado por M **Soledad Isern de Val** para optar al Grado de Doctor, en el Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid, bajo la dirección del Dr. Joaquín Teixidó Calvo.



Fdo. Dr. Joaquín Teixidó Calvo



“Podrán cortar todas las flores,
pero no podrán detener la primavera”

Pablo Neruda

A mis soles

Agradecimientos

La primera vez que entré en un laboratorio iba de la mano de mi padre. Me acuerdo de las poyatas, de las batas blancas y de una ristra de tubos de citómetro ordenados en gradillas. Puede parecer muy ñoño, pero sentí la emoción del que quiere conocer; quería saber y saber: cómo, por qué, cuánto, quería preguntar y ser capaz de responder. Ojalá siempre viviéramos las cosas con esa emoción y el ímpetu del que siente pasión por lo que hace. Nada que no lo provoque merecerá nunca el esfuerzo.

Muchas gracias a todos. Gracias a los que han pasado por mi vida y se han ido, a los que llegaron para quedarse y a los que lucharon por mantenerse, porque todos me habéis enseñado algo.

Gracias a Joaquín, mi director de tesis, por haberme dado la oportunidad y el lugar para comenzar mi carrera profesional.

Gracias a la Dra María García-Parajo por ofrecerme la posibilidad de conocer más a fondo el mundo de la biofísica, y por sus reflexiones y discusiones siempre constructivas. Muchas gracias a Alberto por ayudarme a verlo a través de los ojos de un físico, gracias por haber sido tan buen compañero, por las largas charlas mientras hacíamos los experimentos, por todas las pruebas-error y ¡por los éxitos! Hemos hecho un buen equipo.

Muchísimas gracias al laboratorio del Dr Chris Rudd al completo, donde tuve la gran suerte de realizar la estancia. No puedo expresar la de experiencias positivas que habéis sumado a mi vida. Me acogisteis como una más desde el primer día haciéndome sentir respaldada, escuchada, valorada y respetada, parte del equipo, sin ser nunca una visitante. Gracias especialmente a Asha Recino y Helga Schneider por nuestras discusiones acerca del trabajo, vuestros consejos laborales y de vida y por hacerme cómplice desde el primer momento. Gracias a Raj y sus bromas y piques, y a los *drinks* por las tardes. Ha sido un placer poder sumar esta experiencia.

Gracias igualmente a los jefes de otros laboratorios: Dra M^a Ángeles García-Pardo, Dr Santiago Rodríguez de Córdoba, Dr Ignacio Casal, Dr José Luis Rodríguez Fernández, Dr José Alberto García Sanz, Dr Ángel Luis Corbí y su predisposición a colaborar, prestar y discutir resultados.

Gracias a todos los compañeros con los que he compartido estos años y a aquellos que estuvieron con anterioridad, ya que nuestro trabajo presente está basado en su esfuerzo pasado. Una memoria de tesis, un proyecto, un artículo, un seminario...representan el trabajo de multitud de personas, con diferente implicación, que ha de ser valorado. Quiero expresar mi agradecimiento especialmente a David (mi postdoc por 4 meses y en la distancia) por tu ayuda en esos correos interminables y tus palabras de ánimo, aunque ahora estés en el lado oscuro; y a Ana, gracias a quien aprendí a desenvolverme en el laboratorio. Gracias a Rubén, siempre he podido contar con tu experiencia científica y para mí representas lo que un buen postdoc debiera ser, capaz de ayudar, resolver problemas por sí mismo, así como pedir consejo si lo necesita (estás deseando que diga algo sobre mi postdoc favorito...). Quiero extender mi gratitud a todos los demás compañeros: Pablo, Georgina, Alicia, Marta y Mónica; Silvia, Nohemí, Lucía y Patricia; sólo puedo agradecer los buenos momentos a lo largo de estos años y desearos mucha suerte en vuestro camino futuro.

Gracias igualmente a los compañeros de los laboratorios vecinos: a todas las integrantes del 142 (Mónica Aceves e Irene, mujeres de bandera, y a las veteranas Estefi, Elvira, Emi y Noemí); a los "Santiagos" (especialmente a Sheila, Lucía y Adrián), y a los "Casales" (gracias a todas por vuestras palabras siempre alentadoras).

Gracias a todos los servicios del CIB: en especial a Gema, Maite, Lorena y Rafa de microscopía; a Pedro Lastres del servicio de citometría; al animalario y a todas y cada una de las personas que trabajan en los servicios de esterilización y limpieza, por ser su labor tan importante y ejercerla con tanta modestia, en especial a Gloria, por todo su cariño, su bondad y su alegría.

Muchas gracias a las personas que de verdad me han apoyado en esta etapa, a mis amigos y mi familia. No importa el momento, la situación o el motivo, siempre habéis estado conmigo, escuchándome, siendo un respaldo y una alegría. Cerca o lejos, os tengo siempre. Gracias por haberme acompañado en esta batalla. Gracias por sacarme de mi zona de confort, por remover todos mis cimientos, por pedirme ayuda y serlo para mí; por los abrazos, las fiestas, las risas, los llantos, las bromas...Por los encuentros en vivo y en directo allá donde estuviéramos, por

estar juntos días enteros, o pequeños momentos, por los encuentros por Skype, tan continuos en los últimos tiempos. Por estos años que me han hecho cambiar y me han enseñado tanto. Porque me enseñáis puntos de vista diferentes para analizar el mundo y la vida, para aprender y superarme. Por enseñarme enfoques objetivos y ser subjetivos conmigo. Por ser siempre un punto de inflexión. Por haber creído en mí y empujarme a hacerlo a mí.

Gracias a los bichos, Gabi y Fran, por vosotros no abandoné. Gracias por decirme que podía hacer cualquier cosa, seguir o comenzar de nuevo. Gracias por ayudarme a cerrar una etapa. Porque, Gabi, nos conocimos hace mucho tiempo y nos hemos visto crecer, ampliar nuestros horizontes y superarnos, y lo mejor es que para ello, hemos estado juntas. Porque Fran das abrazos que te hacen sentir en casa. A los viejos nuevos descubrimientos, Cris e Izas, shiquis shiquis, por las risas que nunca decaen, por las tardes hablando y el continuo coaching. Cris, el Ave Fenix. Izas, eres una optimista de la que todos deberíamos aprender, sin el apoyo mutuo de estos últimos meses todo hubiera sido muy diferente, millones de gracias. Gracias a Edu y punto (¡¡quiero que me enseñes a meditar de una vez!!). A Itzi y Raquel, personas que los bichos dejaron en mi vida, estos shiquis atando cabos siempre.

A mi Alberto de mis amores, mi mejor aliado aunque pasen los años, porque con dos palabras nos entendemos (sobre todo si nos las cantamos). Siempre voy a admirar el entusiasmo que eres capaz de transmitir en todo lo que haces. Arriesgaste y ganaste, eres un ejemplo de vocación. Gracias a Pablo, ¡por ser tu favorita y porque vamos a compartir mil chocolatadas más! A las chulas, Balma y María, ¡ratos chulos con personas chulas! ¡Porque la vida es chula!), por nuestros bailes, viajes, “cantes” (esa maldita pared que separa tu vida y la mía!), “limpiezas intensivas”...Por lo que nos hemos apoyado y aportado cuando las cosas iban bien y no tan bien. Por los abrazos grupales. A Balma por empujarme a vivir una experiencia como fue la estancia, por haberme escuchado tantas y tantas veces; a María porque, ya te lo he dicho muchas veces, eres única, auténtica e incansable. Gracias a Irene, mi profesora favorita, por tus consejos siempre a tiempo, por ver las cosas justo a tiempo; por no hacerte ni caso y seguir a mi lado.

Gracias a Rubén, porque jamás nos entenderemos y, sin embargo, aquí seguimos, en medio de esta tormenta. Sigo sin entender por qué a veces te has

visto reflejado en mí pero tus palabras siguen socorriéndome a menudo, sobre todo cuando hablas en serio.

Grazie mile Michaela!!! Grazie, grazie, grazie y ojo!! Life, laugh, love! Nos encontramos por casualidad (y por suerte!) y encontramos una amiga y muchos, muchos buenos momentos. Recuerda: ¡¡Nosotras escribimos el futuro!! Gracias a Vicky y Maria Chiara, la magia de Cambridge nos cautivó, tres no-madrileñas afincadas en la capi y con ganas de pisar (y bailar) con fuerza. Por supuesto...last but not least, gracias Rocío (amiga y coach, doble trabajo) por ser un gran apoyo en la última etapa, gracias por escucharme siempre, guiarme y hacerme ver el camino, por darme las herramientas para hacerlo.

A mi familia, mi mayor tesoro, mi fortaleza, mi orgullo. Juntos somos invencibles y os extraño todos los días. Gracias por vuestro coraje. Gracias a mis hermanos, el mayor regalo que jamás me hicieron mis padres, porque siendo tan diferentes somos en el fondo iguales, rebeldes con causa. Ainhoa, un ejemplo de fortaleza, e Iñigo, un ejemplo de iniciativa. A mi madre, mi sol, mi luna, mis estrellas. A mi padre, por seguir presente en el transcurso de nuestras vidas, estás en nuestro pensamiento siempre. Vuestro ejemplo nos guía a los tres. A mi abuela Rosa Pili porque nos lo das todo sin pedir nada, sólo un beso. Me habéis enseñado que siempre hay una puerta abierta, nunca hay que rendirse. Vosotros iluminaréis mi camino siempre.

“Tantas veces me he perdido y en tus ojos me he vuelto a encontrar.

Tantas veces me he caído y de tu mano me vuelvo a levantar.”

Índice

Índice de contenidos

Abreviaturas	VII-XII
Summary	XIII-XVIII
Resumen	XIX-XXIV
Introducción	1-35
1. Modelo de migración leucocitario	3
2. Las integrinas	5
2.1 Estructura de las integrinas	5
2.2 Regulación de la actividad de las integrinas. Señalización <i>inside-out</i> y <i>outside-in</i>	7
2.3 Proteínas que regulan la activación de las integrinas: talina, kindlin e ICAP-1	9
2.3.1 Talina	10
2.3.2 Modelo de reclutamiento de talina a la membrana celular	11
2.3.3 Kindlin	12
2.3.4 ICAP-1	13
2.4 La integrina $\alpha 4 \beta 1$ y sus ligandos	15
3. Las quimioquinas y sus receptores	18
3.1 La quimioquina CXCL12 y sus receptores	24
4. Proteínas implicadas en señalización <i>inside-out</i>	26
4.1 Las GTPasas de la superfamilia Ras	26
4.1.1 Las GTPasas Rho	27
4.1.2 GEF de las GTPasas Rho. La familia Vav	28
4.2 SLP-76	30
4.3 ADAP	32
4.4 SKAP-1	33
Objetivos	37-39
Materiales y Métodos	41-63
1. Cultivos celulares y purificación de linfocitos T	43
2. Anticuerpos	44
3. Vectores de expresión y siRNAs	45
4. Transfección celular	46
5. Western blotting	47
5.1 Inmunoprecipitación	48
5.2 Ensayos de actividad GTPasa	48
5.3 Ensayos de fraccionamiento celular	49
6. Citometría de flujo	49
6.1 Ensayos de unión soluble de VCAM-1	49
6.2 Detección de las formas activadas de integrinas $\beta 1$	50
6.3 Ensayos de polimerización de actina	50
6.4 Ensayos de quimiotaxis	51
6.5 Ensayos de migración transendotelial	51
6.6 Ensayos de Viabilidad celular con Anexina-Ioduro de Propidio	51
7. Ensayos de proliferación celular con el reactivo CCK-8	52
8. Ensayos de adhesión celular estática	52
9. Ensayos de adhesión celular en cámaras de flujo	53
10. Ensayos de <i>spreading</i> celular	55
11. Ensayos de motilidad celular utilizando microscopía en tiempo real	55
12. Análisis mediante transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)	55
13. Genotipado de los ratones ICAP-	56
14. Microscopía confocal y microscopía de super-resolución STED (<i>Stimulated emission depletion</i>)	57
15. <i>Single Particle Tracking</i>	58

15.1 Preparación de las muestras	58
15.2 Adquisición de imágenes	58
15.3 Análisis de las trayectorias	59
16. Análisis estadístico	61
Resultados	63-124
1. Papel de SLP-76, ADAP y SKAP-1 en la regulación de la adhesión dependiente de $\alpha 4 \beta 1$ en respuesta a quimioquinas	65-94
1. Papel de SLP-76 y ADAP en la adhesión de linfocitos T mediada por $\alpha 4 \beta 1$ en respuesta a quimioquinas.	67
2. La adquisición de conformaciones de alta afinidad de $\alpha 4 \beta 1$ tras la estimulación con CXCL12 es independiente de SLP-76 y ADAP.	72
3. Papel de SLP-76 y ADAP en el reforzamiento de la adhesión y spreading celular mediado por $\alpha 4 \beta 1$.	74
4. Papel de Rac1 en la regulación por SLP-76 y ADAP de la adhesión celular dependiente de $\alpha 4 \beta 1$ en respuesta a CXCL12.	75
5. Relaciones funcionales entre ADAP y Pyk2 en la activación de Rac y en la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4 \beta 1$ en respuesta a quimioquinas.	79
6. Papel de SKAP-1 en la estimulación por quimioquinas de la adhesión de linfocitos T mediada por $\alpha 4 \beta 1$.	83
7. La generación de conformaciones de alta afinidad de $\alpha 4 \beta 1$ en respuesta a estimulación con CXCL12 es independiente de SKAP-1.	91
8. SKAP-1 regula la activación de las GTPasas Rho.	92
2. Papel de ICAP-1 en el proceso de adhesión mediado por $\alpha 4 \beta 1$.	95-105
1. Papel de ICAP-1 en la adhesión de linfocitos T dependiente de $\alpha 4 \beta 1$.	97
2. ICAP-1 regula negativamente la adquisición de conformaciones de alta afinidad de $\alpha 4 \beta 1$ estimulada por quimioquina.	103
3. La ausencia de ICAP-1 no modifica las proporciones en las poblaciones celulares circulantes en sangre periférica.	104
3. Dinámicas de difusión y movilidad lateral de la integrina $\beta 1$.	107-121
1. La movilidad de $\beta 1$ disminuye en presencia de la quimioquina CXCL12.	110
2. La movilidad de $\beta 1$ disminuye en presencia de la quimioquina CXCL12.	116
Discusión	123-140
1. Papel de SLP-76, ADAP y SKAP-1 en la regulación de la adhesión dependiente de $\alpha 4 \beta 1$ en respuesta a quimioquinas.	125
2. Papel de ICAP-1 en el proceso de adhesión mediado por $\alpha 4 \beta 1$.	134
3. Dinámicas de difusión y movilidad lateral de la integrina $\beta 1$.	136
Conclusiones	141-143
Bibliografía	145-170
Anexos	171

Índice de figuras

Figura 1. Etapas de la migración leucocitaria.	4
Figura 2. La familia de las integrinas.	5
Figura 3. Estructura de las integrinas.	6
Figura 4. Señalización <i>Outside-in</i> e <i>Inside-out</i> .	9
Figura 5. Proteínas intracelulares que se unen al dominio citoplasmático de las subunidades $\beta 1$ y regulan la activación de las integrinas.	10
Figura 6. Organización en dominios de Talina.	11
Figura 7. Modelo de reclutamiento y activación de talina en la membrana celular.	12
Figura 8. Las proteínas Kindlin.	13
Figura 9. Estructura de ICAP-1 α .	14
Figura 10. Estructura de VCAM-1 y fibronectina.	17
Figura 11. Estructura de las quimioquinas.	19
Figura 12. Vías de señalización intracelular estimuladas por las distintas subunidades G α acopladas a los receptores de quimioquinas.	23
Figura 13. Señales estimuladoras <i>inside-out</i> de las integrinas.	24
Figura 14. Regulación de la actividad GTPasa de la familia Rho.	27
Figura 15. Organización modular de las proteínas Vav.	29
Figura 16. Estructura modular de SLP-76 humana.	31
Figura 17. Estructura modular de ADAP humana.	32
Figura 18. Estructura modular de SKAP-1 (SKAP-55) humana.	34
Figura 19. Esquema del montaje del circuito de adhesión en cámara de flujo.	54
Figura 20. Modelo del análisis de las trayectorias individuales de las integrinas $\beta 1$ gracias a un algoritmo de MatLab.	60
Figura 21. Representación de los desplazamientos cuadráticos medios promediados en cada punto de todas las trayectorias en función del tiempo.	61
Figura 22. Dinámica de las asociaciones de SLP-76 con Vav1 y ADAP en respuesta a CXCL12.	68
Figura 23. Dinámica de la asociación de Vav1 con SLP-76 en células silenciadas para ADAP.	69
Figura 24. Papel de SLP-76 y ADAP en la adhesión y migración transendotelial de células T dependiente de $\alpha 4 \beta 1$ en respuesta a quimioquinas.	71
Figura 25. Papel de SLP-76 y ADAP en la adhesión en condiciones de flujo de células T a VCAM-1 en respuesta a CXCL12.	72
Figura 26. Papel de SLP-76 y ADAP en la regulación de la afinidad y aidez de $\alpha 4 \beta 1$.	73
Figura 27. Papel de SLP-76 y ADAP en el reforzamiento de la adhesión de linfocitos T a VCAM-1 en respuesta a CXCL12.	75
Figura 28. Papel de SLP-76 y ADAP en la activación de Rac1.	76
Figura 29. Papel de SLP-76 y ADAP en la fosforilación de Vav1.	77
Figura 30. La regulación por SLP-76 y ADAP de la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4 \beta 1$ es mediada por la activación de Rac1.	78
Figura 31. Papel de Pyk2 en la fosforilación de Vav1 en respuesta a CXCL12.	80
Figura 32. Análisis de las relaciones funcionales entre ADAP y Pyk2 en la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4 \beta 1$ en respuesta a CXCL12.	81
Figura 33. Efecto de la co-transfección del siRNA para ADAP y el vector PRNK en la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4 \beta 1$ en respuesta a CXCL12.	82
Figura 34. Análisis de la asociación de SKAP-1 con ADAP y RIAM.	83
Figura 35. Silenciamiento y sobreexpresión de SKAP-1 en células Molt-4.	85
Figura 36. Papel de SKAP-1 en la estimulación por CXCL12 de la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4 \beta 1$.	86
Figura 37. Papel de SKAP-1 en la migración de linfocitos T dependiente de $\alpha 4 \beta 1$.	87
Figura 38. Análisis de la motilidad celular sobre VCAM-1/CXCL12 de linfocitos T SKAP-1 $+/+$ y SKAP-1 $-/-$.	89
Figura 39. Papel de SKAP-1 en la adhesión de células T a VCAM-1/CXCL12 en condiciones de flujo.	90
Figura 40. El <i>spreading</i> de linfocitos T es independiente de SKAP-1.	91
Figura 41. SKAP-1 no regula la afinidad de $\alpha 4 \beta 1$.	92
Figura 42. SKAP-1 regula la activación de Rac1 y RhoA-MLC en linfocitos T.	94
Figura 43. Análisis de la asociación de ICAP-1 con $\beta 1$.	98

Figura 44. Genotipado y caracterización de ratones <i>knock out</i> para SKAP-1.	99
Figura 45. Silenciamiento de ICAP-1 en células Molt-4.	100
Figura 46. Papel de ICAP-1 en la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4 \beta 1$.	100
Figura 47. Papel de ICAP-1 en la adhesión de linfocitos a VCAM-1 en condiciones de flujo.	102
Figura 48. Papel de ICAP-1 en la regulación de la expresión de formas de alta afinidad de $\alpha 4 \beta 1$.	103
Figura 49. Análisis de la motilidad celular sobre VCAM-1/CXCL12 de linfocitos T ICAP-1 +/+ y ICAP-1 -/-.	104
Figura 50. Imagen representativa de la localización y el seguimiento de las moléculas de $\beta 1$ marcadas con QDots en el lado dorsal de los linfocitos.	110
Figura 51. Formas analíticas de los diferentes tipos de difusión.	111
Figura 52. El coeficiente de difusión de cada célula individual fue analizado y representado en una gráfica de dispersión.	111
Figura 53. Distribución de los coeficientes de difusión D de las trayectorias de las integrinas $\beta 1$ de células fijadas.	112
Figura 54. Distribución de los coeficientes de difusión D de todas las trayectorias representados en un histograma semi-logarítmico.	113
Figura 55. Análisis cuantitativo del comportamiento difusivo de la integrina $\beta 1$ en presencia de CXCL12.	114
Figura 56. Análisis de la activación de $\beta 1$ en respuesta a diferentes estímulos.	117
Figura 57. Procesamiento de las imágenes de nanoscopía de super-resolución STED.	119
Figura 58. Análisis de las imágenes de microscopía de super-resolución STED de la intensidad de fluorescencia de los <i>spots</i> en presencia de CXCL12, VCAM-1 y VCAM-1/CXCL12.	121
Figura 59. Modelo del papel de proteínas asociadas a Vav1 en la regulación de la adhesión dependiente de $\alpha 4 \beta 1$ mediada por quimioquinas.	134
Figura 60. Modelo de la movilidad de las integrinas $\beta 1$.	140

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de las quimioquinas en diferentes familias.	21
Tabla 2. Anticuerpos utilizados.	44-45
Tabla 3. Relación de siRNAs empleados.	46
Tabla 4. Relación de oligonucleótidos utilizados.	56
Tabla 5. Protocolo de qPCR.	56
Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados en el genotipado de los ratones ICAP-1 +/+, ICAP-1 +/- y ICAP-1 -/-.	56
Tabla 7. Protocolo de PCR utilizado en el genotipado de los ratones ICAP-1 +/+, ICAP-1 +/- y ICAP-1 -/-.	57
Tabla 8. Buffers utilizados.	62
Tabla 9. Análítica de sangre periférica de ratones ICAP-1 +/+ y ICAP-1 -/-.	105
Tabla 10. Análisis de las poblaciones móviles y estacionarias de $\beta 1$ en condiciones basales y tras el estímulo con CXCL12.	116

Abreviaturas

ADAP	<i>Adhesion and degranulation protmoting adaptor protein</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Akt	<i>Protein kinase B</i> , proteínas quinasa B
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> , anl��sis de varianza
APC	<i>Antigen-presenting cell</i> , c��lula presentadora de ant��geno
ARN	��cido ribonucleico
BCECF-AM	<i>2',7'-bis (carboxyethyl)-5(6')-carboxyfluorescein-acetoxymethyl ester</i> , 2'-7' bis (carboxietil)-5(6')-carboxifluoresceinato de acetoximetri ester
BCR	<i>B-cell receptor</i> , receptor de c��lulas B
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , alb��mina de suero bovino
CaMKII	<i>Calmodulina Protein Kinasa II</i>
CCM1	<i>Cerebral cavernous malformation 1</i>
Cdc42	<i>Cell division control protein 42</i>
CPD	<i>Cumulative Probability Distribution</i>
DH domain	<i>Dbl Homology domain</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> , medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	<i>Dimetrhyl sulfoxide</i> , dimetil sulf��sido
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> , ácido etileno-diamino-tetraac��tico
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGTA	<i>Ethyleneglycol-bis(β-aminoethyl)-N, N, N', N'-tetraacetic Acid</i> , etileno-glicol-bis(β -aminoetil)- N, N, N', N'-tetra-ac��tico
Erk1/2	<i>Extracelular signal-regulated kinase</i> , quinasa regulada por señales extracelulares
EVH1	<i>Enabled/VASP homology 1</i>
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i> , quinasa de adhesión focal
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> , suero bovino fetal
FERM	F: proteína 4.1 , E: ezrina, R: radixina y M: moesina
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> , isocianato de fluoresce��na
FN-H89	<i>Fibronectin fragment H89</i> , fragmento H89 de la fibronectina
GADS	<i>Grb2-Related Adaptor Downstream of Shc</i>

GAP	<i>GTPase-activating protein</i> , proteína activadora de actividad GTPasa
GDI	<i>GDP-dissociation inhibitor</i> , inhibidor de disociación de GDP
GDP	<i>Guanine 5'-diphosphate</i> , guanina 5'-difosfato
GEF	<i>Guanine nucleotide Exchange factor</i> , factor intercambiador de nucleótidos de guanina
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> , proteína verde fluorescente
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i> , receptor acoplado a proteínas G heterotriméricas
GRK	<i>G-protein associated kinase</i> , quinasa asociada a proteína G
GST	<i>Gluthation sulphur transferase</i> , transferasa de azufre a glutation
GTP	<i>Guanine 5'-triphosphate</i> , guanina 5'-trifosfato
GTPasa	Guanosina trifosfatasa
HEPES	<i>4-(2-hidroxethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid</i> , ácido 4-(2-hidroxietyl) piperacina-1-etanosulfónico
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HPK1	<i>Hematopoietic progenitor kinase 1</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> , peroxidasa de rábano
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i> , moléculas de adhesión intercelular
ICAP-1	<i>Integrin cytoplasmic domain-associated protein-1</i>
IFN	Interferon gamma
IRM	<i>Interference of the reflection microscopy</i> , microscopía basada en la interferencia de la reflexión
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITK	<i>IL2-Inducible T-Cell Kinase</i>
JAK	<i>Janus kinase</i> , quinasa janus
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i> , quinasa N-terminal de c-Jun
Krit1	<i>Krev Interaction Trapped</i>
LAT	<i>Linker for Activation of T cells</i>
Lck	<i>Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>
LFA-1	<i>Leukocyte function-associated antigen 1</i> , antígeno 1 asociado a la función de leucocitos
MadCAM-1	<i>Mucosal addressin cells Xdhesion molecule-1</i> , molécula de adhesión celular de adresinas mucosas-1
Mac-1	<i>Macrophage-1 antigen</i>

MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> , quinasa de proteínas activadas por mitógenos
MIDAS	<i>Metal ion-dependent adhesion site</i>
MSD	<i>Mean Square Displacement</i>
Mst1	<i>Hepatocyte growth factor-like protein</i>
Nck	<i>Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor-κB</i> , factor nuclear κ B
NK	<i>Natural Killer</i>
NNM	<i>Nearest Neighbour Model</i>
PAGE	<i>Poliacrylamide gel electrophoresis</i> , electroforesis en geles de poliacrilamida
PAK	<i>p-21 Activated kinase</i>
PBL-T	<i>Peripheral blood lymphocyte T</i> , linfocito T de sangre periférica
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , solución salina tamponada con fosfatos
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i> , factor de crecimiento derivado de plaquetas
PH	<i>Pleckstrin-homology domain</i> , dominio de homología con pleckstrina
PI ₃ K	<i>Phosphatidylinositol-3-kinase</i> , quinasa fosfatidilinositol-3
PIP ₂	<i>Phosphatidylinositol-4,5-kinase</i> , quinasa fosfatidilinositol-4,5
PIP ₃	<i>Phosphatidylinositol-3, 4, 5-kinase</i> , quinasa fosfatidilinositol-3, 4, 5
PKA	<i>AMPC-dependent protein-kinase</i> , proteín-quinasa dependiente de AMPc
PKC	<i>Calcium-dependent protein-kinase</i> , proteín-quinasa dependiente de calcio
PLC	<i>Phospholipase C</i> , fosfolipasa C
PMA	Forbol 12-miristato 14-acetato
PR	<i>Proline-rich regions</i> , regiones ricas en prolina
Pyk2	<i>Proline-rich tyrosine kinase 2</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i> , difluoruro de polivinilideno
QDots	<i>Quantum Dots</i>
Rac	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
Rap1	<i>Ras-proximate-1</i> o <i>Ras-related protein 1</i>
RhoA	<i>Ras homolog gene family, member A</i>
RIAM	<i>Rap1-GTP-interacting adaptor molecule</i>
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcription-polimerase chain reaction</i> , ensayo de transcripción

	inversa y reacción en cadena de la polimerasa
SAM	<i>Sterile alpha motif</i>
SDF-1	<i>Stromal-cell derived factor-1</i> , factor derivado de células estromales-1
SCID	<i>Severe combined immunodeficiency</i> , inmunodeficiencia combinada severa
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , dodecilsulfato de sodio
SFK	<i>Src family kinase</i>
SH ₂	<i>Src-homology domain 2</i> , dominio 2 de homología con Src
SH ₃	<i>Src-homology domain 3</i> , dominio 3 de homología con Src
shRNA	<i>Interfering short-hairpin RNA</i> , horquilla de ARN interferente
siRNA	<i>Small interfering ribonucleic acid</i> , oligoribonucleótido de interferencia
SKAP-1	<i>Src kinase associated phosphoprotein 1</i>
SLP-76	<i>SH₂ domain-containing leukocyte protein of 76 kDa</i>
Src	<i>Sarcoma tyrosine-kinase</i> , tirosín-quinasa sarcoma
Stat	<i>Signaling transducer and activator of transcription</i> , transductor de señal y activador de transcripción
STED	<i>Stimulated emission depletion</i>
SPT	<i>Single Particle Tracking</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i> , receptor de células T
TGF-β1	<i>Transforming growth factor-β1</i> , factor de crecimiento transformante β1
TIRFM	<i>Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy</i>
TMD	<i>Transmembrane Domain</i>
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor-α</i> , factor de necrosis tumoral α
UV	<i>Ultraviolet light</i> , luz ultravioleta
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i> , molécula de adhesión de células endoteliales-1
VLA-4	<i>Very late antigen-4</i>
WASP	<i>Wiskott–Aldrich Syndrome protein</i>
ZAP-70	<i>Zeta-chain-associated protein kinase 70</i>
ZF	<i>Zinc-fingers</i> , dedos de zinc

Summary

Introduction

Integrin $\alpha 4\beta 1$ is essential for migration of T lymphocytes from the blood compartment to the tissues. Stimulation by chemokines of integrin $\alpha 4\beta 1$ -dependent T lymphocyte adhesion is a crucial step for lymphocyte trafficking. It generates an inside-out signaling which triggers a quick and transient increase of the activity of $\alpha 4\beta 1$. Integrin activation is associated with conformational changes after the interaction of activator proteins with the cytoplasmic domain of β subunits. Vav1 is an essential protein in inside-out signaling. Conceivably, proteins that are associated with Vav1, like SLP-76, ADAP and SKAP-1, could potentially modulate this adhesion.

The binding of talin and kindlin-3 to the cytoplasmic domains of β subunits could be counteracted by the action of competitor proteins. ICAP-1, an integrin inhibitor, could be an important molecule in the adhesion process.

The required molecules for inside-out signaling have been fairly characterized, but the potential lateral diffusion of β subunit after stimulation by chemokines is hardly known. Single Particle Tracking technique allows analyzing integrin mobility in membranes with high resolution.

Objectives

In this context, the work that makes up this Doctoral Thesis is organized around three main objectives:

- Analysis of the role of SLP-76, ADAP and SKAP-1 in the $\alpha 4\beta 1$ -dependent T lymphocyte adhesion mediated by chemokines.
- Analysis of the role of ICAP-1 in chemokine-activated T cell adhesion mediated by $\alpha 4\beta 1$.
- Dynamics of the diffusion of the integrin $\beta 1$ in the presence of CXCL12.

Methodology

We used T lymphocytes from peripheral blood of healthy donors, human T-cell line Molt-4 and T lymphocytes from SKAP-1 KO, ICAP-1 KO and wild type mice.

Gene silencing and protein overexpression were performed by transfection with specific siRNAs and vectors pEGFP, respectively. Expression of mRNA was measured by qPCR and protein expression was analyzed by Western blotting. Protein association was analyzed by immunoprecipitation. The study of chemokine-stimulated, $\alpha 4\beta 1$ integrin-mediated, T lymphocyte adhesion was made using both static adhesion assays and adhesion assays under flow conditions upon VCAM-1/CXCL12. Additionally, we performed time-lapse microscopy experiments, chemotaxis and transendothelial migration assays towards CXCL12. We performed flow cytometry assays using the antibody HUTS-21 and the ligand VCAM-1-Fc to analyze the conformational states of the integrin $\alpha 4\beta 1$. $\beta 1$ diffusion in membrane in the presence of CXCL12 was studied by Single Particle Tracking assays, while $\alpha 4\beta 1$ clustering afterwards stimulation with chemokine and/or ligand was assessed by means of STED imaging. Data were analyzed by one-way analysis of variance, followed by Tukey-Kramer multiple comparisons. In both analyses, the minimum acceptable level of significance was $p < 0.05$.

Results

Given the key role of Vav1 in chemokine-stimulated, $\alpha 4\beta 1$ -dependent T cell adhesion, we analyzed the function of Vav1-binding partners in this adhesion process. We focused the study on SLP-76, as well as on the possible implication in this process of ADAP and SKAP-1. SLP-76 and ADAP were essential to an optimal $\alpha 4\beta 1$ dependent T cell adhesion mediated by CXCL12 under flow conditions. Furthermore, dynamic associations among Vav1, SLP-76 and ADAP could regulate $\alpha 4\beta 1$ -mediated T cell adhesion. Besides, we found a reduction in the strength of adhesion and in spreading mediated by $\alpha 4\beta 1$ following stimulation by chemokines in ADAP-depleted cells. We observed as well a reduction in cellular spreading in SLP-76-depleted cells. Moreover, our data suggested that ADAP and SLP-76 are adaptors for the activation of Rac promoted by Vav1 in T cells. Furthermore SKAP-1 regulated mainly adhesion strengthening process. The increase in the motility of SKAP-1 $-/-$ lymphocytes suggested a major activation of migration mechanisms. In line with this hypothesis, we observed a higher RhoA GTPase activation and MLC phosphorylation (pMLC) in SKAP-1 $-/-$ T cells. The stimulation of RhoA-pMLC pathway is involved in polarization, contractility and cell migration, and the

activation of these proteins could represent a mechanism to stimulate lymphocyte migration, representing an opposing force to the adhesion of T cells to VCAM-1. Additionally, SKAP-1 $-/-$ T lymphocytes showed a higher activation of Rac, indicating that SKAP-1 may be a repressor of Rac and RhoA GTPases.

Another aim of this Thesis was to elucidate the role of ICAP-1 in $\alpha 4\beta 1$ -dependent T cell adhesion stimulated by chemokines. ICAP-1 played an important role in early steps of cell adhesion and it was a suppressor of the $\alpha 4\beta 1$ activation. Preliminary assays didn't show obvious evidences of competitions between talin and kindlin-3 with ICAP-1 in the binding to $\beta 1$ integrins.

Finally, we studied the diffusion of integrin $\beta 1$ and their clustering in cell membrane in the presence of CXCL12. Lateral diffusion of the total population $\beta 1$ was set to a random Brownian motion, showing two different subpopulations: a small immobile fraction and a main mobile subpopulation. After stimulation with CXCL12 the diffusive behavior of $\beta 1$ integrins changed: the diffusion coefficient of the total population decreased, and the fraction of immobile molecules increased significantly. The analysis of confocal microscopy images, as well as flow cytometry assays, showed no significant activation of $\beta 1$ integrin following stimulation with CXCL12. However, stimulation with the ligand VCAM-1 and the combination of both stimuli (VCAM-1/CXCL12) significantly enhanced the fluorescence intensity. These data indicate an increase in the number of molecules with high affinity conformations after such stimuli. Analysis of super-resolution STED imaging didn't allowed to discriminate the size of the clusters. The study of the fluorescence intensity of fluorescent spots showed a tendency to increase the number of $\alpha 4\beta 1$ integrin in its active conformation due to stimulation with CXCL12, VCAM-1 and VCAM-1/CXCL12 in solution, which led to a higher value of the fluorescence intensity of fluorescent spots and a decrease in distance between them.

Conclusions

In conclusion, we showed that SLP-76, ADAP and SKAP-1 regulate integrin $\alpha 4\beta 1$ -dependent T-lymphocyte adhesion stimulated by chemokines. On the other hand ICAP-1 is an inhibitor of the $\alpha 4\beta 1$ -dependent T-lymphocyte adhesion. Finally, CXCL12 triggers an increase of the $\beta 1$ immobile population. The results of

this Thesis contribute to the improvement of our understanding of the molecular mechanisms that control T cells trafficking to inflammation sites.

Resumen

Introducción

La integrina $\alpha 4\beta 1$ es una molécula de adhesión esencial en la migración de linfocitos T desde el compartimento sanguíneo hacia el interior de los tejidos. La estimulación de linfocitos T con quimioquinas genera una señalización *inside-out* que se traduce en un aumento rápido y transitorio de la actividad de $\alpha 4\beta 1$. La interacción de proteínas activadoras con los dominios citoplasmáticos de las subunidades β , se traduce en un incremento de la afinidad de $\alpha 4\beta 1$ por sus ligandos y un posterior reforzamiento de la adhesión. Un componente esencial de la señalización *inside-out* que regula la activación de $\alpha 4\beta 1$ es la proteína Vav1. Consecuentemente, es razonable proponer que las proteínas que se asocian a Vav1 podrían modular asimismo dicha adhesión.

La unión de proteínas activadoras a la subunidad $\beta 1$ podría ser contrarrestada por moléculas competidoras de dichos motivos, como la proteína citoplasmática ICAP-1, la cual podría ser relevante en el proceso de adhesión.

Aunque las moléculas requeridas durante la señalización *inside-out* han sido caracterizadas, poco se sabe sobre la potencial difusión lateral de esta integrina en respuesta a dicha señalización.

Objetivos

La presente Tesis se organiza en tres objetivos principales:

- Análisis del papel de SLP-76, ADAP y SKAP-1 en la adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$ estimulado por quimioquinas.
- Análisis del papel de la proteína ICAP1 en la adhesión mediada por $\alpha 4\beta 1$ en linfocitos T.
- Estudio de la dinámica de movimiento de las integrinas $\alpha 4\beta 1$ en presencia de quimioquina.

Metodología

Hemos utilizado linfocitos T procedentes de la sangre periférica de pacientes sanos, la línea T Molt-4 y linfocitos T procedentes de ratones *KN* y *wild*

type. El silenciamiento génico y la sobre-expresión de proteínas se realizó mediante nucleotransfección con siRNAs y vectores pEGFP, respectivamente. La expresión de mRNA se determinó mediante qPCR y la de proteínas mediante *western blotting*. La asociación de proteínas se determinó mediante inmunoprecipitación. El estudio de la adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$ mediado por quimioquinas se hizo en ensayos de adhesión estática y en flujo en presencia de VCAM-1/CXCL12. Asimismo, se realizaron experimentos de microscopía en tiempo real sobre VCAM-1/CXCL12, quimiotaxis y migración transendotelial hacia CXCL12. El nivel de adquisición de las conformaciones de alta afinidad se analizó mediante ensayos de citometría de flujo utilizando el anticuerpo HUTS-21 y el ligando VCAM-1-Fc. La difusión en membrana de $\beta 1$ fue analizada gracias a ensayos de *Single Particle Tracking*, y el grado de *clustering* de dicha integrina fue analizado en imágenes STED. Para analizar las diferencias estadísticamente significativas fueron utilizados la prueba T de Student y el test de ANOVA, seguido de un análisis de comparación Turkey-Kramer. El nivel de significación fue $p < 0,05$.

Resultados

Dado el importante papel de Vav1 en la regulación por quimioquinas de la adhesión de linfocitos T dependiente de $\alpha 4\beta 1$, se propuso un estudio sobre la función de proteínas que se asocian con Vav1 en este proceso de adhesión, enfocando el análisis en SLP-76, ADAP y SKAP-1. SLP-76 y ADAP contribuyen a una óptima estimulación por CXCL12 de la adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$ de células T en condiciones de flujo. Asimismo las dinámicas de asociación entre Vav1, SLP-76 y ADAP podrían regular la adhesión mediada por $\alpha 4\beta 1$ en linfocitos T. La disminución en la adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$ de los linfocitos T deplecionados para SLP-76 o ADAP no se correlacionó con alteraciones en la afinidad de $\alpha 4\beta 1$. Nuestros resultados señalaron la importancia de ADAP como modulador del reforzamiento de la adhesión y del posterior *spreading*, mientras SLP-76 estaría implicado en el proceso de *spreading* celular. Asimismo, SLP-76 y ADAP funcionan probablemente como adaptadores que optimizan la activación de Rac en respuesta a quimioquinas, siendo la activación de Rac1 el resultado de mecanismos tanto dependientes como independientes de Vav1.

Por otro lado, SKAP-1 modularía principalmente la etapa de reforzamiento de la adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$. La mayor motilidad de linfocitos SKAP-1^{-/-} sobre VCAM-1/CXCL12 sugiere la posible estimulación de mecanismos relacionados con activación de migración celular. En línea con esta hipótesis, observamos mayor activación de la GTPasa RhoA y fosforilación de MLC (pMLC) en los linfocitos T SKAP-1^{-/-}, lo cual podría representar una fuerza opuesta a la adhesión sobre VCAM-1. Dichos linfocitos exhibieron mayor activación de Rac, lo que en conjunto indica que SKAP-1 tiene un papel represor en la activación de Rac y RhoA.

Hemos comprobado asimismo que ICAP-1 juega un papel importante en las primeras etapas de la adhesión, regulando negativamente la activación de $\alpha 4\beta 1$. Nuestros experimentos preliminares no han encontrado claras evidencias de competición entre talina y kindlin-3 con ICAP-1 en la asociación con la subunidad $\beta 1$.

Por último, se ha estudiado la difusión lateral de las integrinas $\beta 1$ y su *clustering* en membrana de células T en presencia de CXCL12. En condiciones basales la difusión lateral de la población $\beta 1$ total se ajusta a un movimiento browniano, observándose una fracción estacionaria minoritaria y una subpoblación móvil rápida. Tras la estimulación con CXCL12 la población inmóvil aumentó notablemente. El aumento de la población $\beta 1$ estacionaria no fue relacionado con una activación significativa de éstas tras la exposición celular con CXCL12. Sin embargo, la combinación CXCL12/VCAM-1 produjo un aumento del número de moléculas $\beta 1$ con conformaciones de alta afinidad, sugiriendo que la presencia del ligando estabilizaría dichas conformaciones.

El análisis de las imágenes de super-resolución STED reveló una tendencia al incremento del número de integrinas en su conformación activa debido a los estímulos con CXCL12, VCAM-1 y VCAM-1/CXCL12, lo cual conlleva un aumento de la intensidad de fluorescencia de los *spots* fluorescentes y una disminución en la distancia entre estos.

Conclusiones

En conjunto, en esta Tesis se muestra el importante papel de las proteínas SLP-76, ADAP y SKAP-1 durante la estimulación por quimioquinas de la adhesión

de linfocitos T dependiente de $\alpha 4\beta 1$. Asimismo, mostramos que ICAP-1 actúa como molécula represora de dicha adhesión. Finalmente, hemos mostrado que la quimioquina CXCL12 induce un aumento de la población estacionaria de integrinas $\beta 1$. Los resultados de esta Tesis contribuirán a mejorar nuestro conocimiento de los mecanismos moleculares que controlan el tráfico de linfocitos T hacia lugares de inflamación.

Introducción

1. Modelo de migración leucocitario

Los leucocitos son células migratorias capaces de circular desde su lugar de origen y maduración (timo o médula ósea), y recircular a través de tejidos linfoides especializados y tejidos extralinfoides periféricos¹. La recirculación linfocitaria es crucial para el desarrollo de una respuesta inmune efectiva²⁻⁶. Tras la activación de las células T, éstas se diferencian a células efectoras en los tejidos linfoides secundarios, y posteriormente migran hacia los sitios de infección donde ejercen su actividad efectora, eliminando a los patógenos directa o indirectamente a través de la activación de otros tipos de leucocitos⁴. Este complejo proceso de migración es facilitado por **receptores de quimioquinas, selectinas, CD44 e integrinas (Figura 1)**.

Debido a la alta velocidad a la que circulan los linfocitos en el interior de los vasos sanguíneos, se requieren mecanismos especializados que les permitan interactuar con el endotelio vascular, resistir el flujo sanguíneo y realizar la extravasación⁷. Este proceso consiste en una serie de pasos secuenciales mediados por moléculas de adhesión y receptores de quimioquinas^{2,3,8-11}. Inicialmente, se produce la interacción reversible de glicoconjugados de los leucocitos con selectinas presentes en las células endoteliales (E- y P-selectina), las cuales median el **tethering** (captura inicial) y **rolling** (rodamiento) de dichos leucocitos sobre el endotelio^{12,13}. El **rolling** mediado por las selectinas es un proceso dinámico que requiere la formación y rotura de uniones, lo cual provoca un rodamiento más lento. Se ha descrito que las integrinas $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 4\beta 7$ pueden participar asimismo en el **tethering y rolling**¹⁴.

Después de estos primeros contactos, la disminución de la velocidad de los leucocitos permite su interacción con quimioquinas presentes en el endotelio vascular, tales como CCL21, CXCL12 y CXCL13. Estas quimioquinas se localizan en la superficie apical del endotelio y se unen con receptores de quimioquinas acoplados a proteínas G presentes en la membrana leucocitaria^{8,15,16}. La activación de estos receptores desencadena una señalización intracelular que lleva a la activación de las integrinas leucocitarias (señalización *inside-out*), la cual juega un papel clave en la adhesión firme sobre el endotelio^{17,18}. Este proceso es crucial, ya

que los leucocitos circulantes mantienen sus integrinas en un estado inactivo de baja afinidad, por lo que la afinidad de estas moléculas debe aumentar para reforzar la adhesión leucocitaria⁹. La señalización *inside-out* tiene lugar en condiciones fisiológicas en una fracción de segundo, lo que se traduce en un aumento de la adhesión firme de los leucocitos sobre el endotelio vascular. Las integrinas más importantes en dicha adhesión son $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4), $\alpha L\beta 2$ (LFA-1), $\alpha M\beta 2$ (Mac-1) y $\alpha 4\beta 7$ ^{19,20}, las cuales interactúan con moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas tales como VCAM-1, ICAM-1 y MadCAM-1.

La adhesión de los leucocitos sobre el endotelio puede ser reversible, de modo que los leucocitos pueden volver a circulación sanguínea si no reciben señales adicionales que estimulen su migración transendotelial^{1,21}. En caso de recibir dichas señales, los leucocitos se polarizan y migran a través del endotelio a favor de un gradiente de factores quimioatrayentes^{2,3,9,22-25}. La **transmigración** o diapédesis a través del endotelio constituye el paso final en el proceso de la migración leucocitaria hacia lugares de inflamación. La diapedesis puede realizarse por vía paracelular y, en ocasiones, de manera transcelular²⁶.

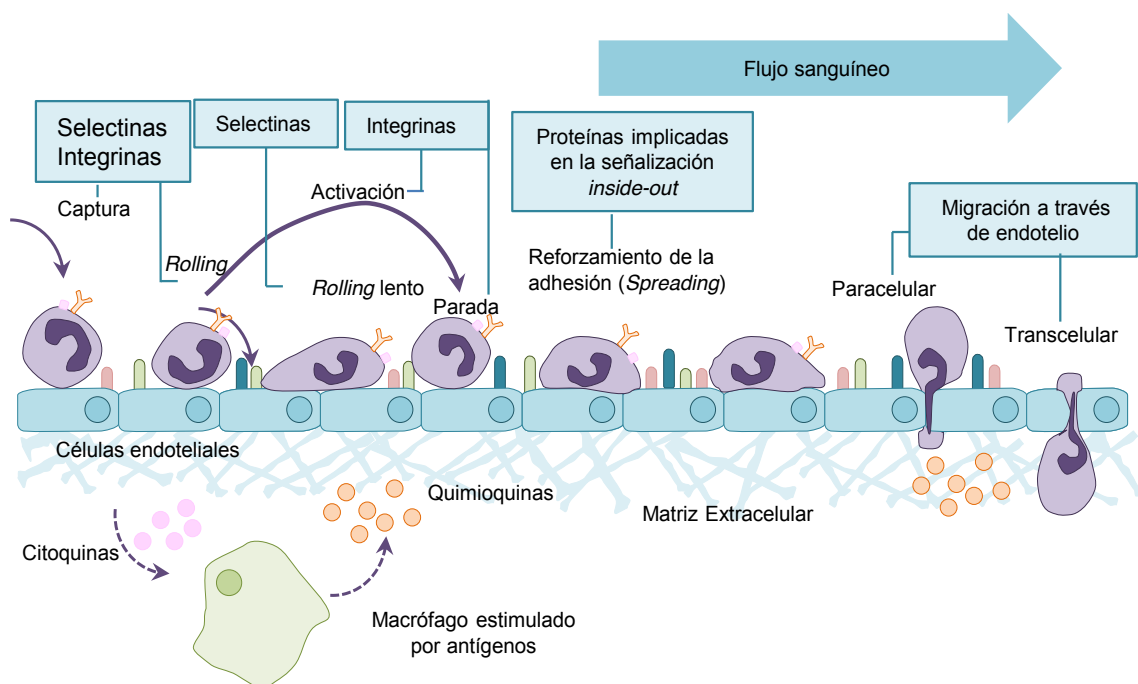


Figura 1. Etapas de la migración leucocitaria. El proceso de migración leucocitaria consiste en una serie de pasos secuenciales mediados por moléculas de adhesión presentes en la superficie del leucocito y sus ligandos sobre el endotelio vascular, así como por receptores de quimioquinas. Las interacciones están reguladas de forma independiente, permitiendo una especificidad muy elevada en la migración. Adaptado de Ley et al., 2007²⁷.

2. Las integrinas

Las etapas de adhesión en el proceso de migración leucocitaria son dinámicas y transitorias, por lo que confieren movilidad celular, la cual es indispensable en la función inmune. Como ya se ha mencionado, la adhesión leucocitaria está mediada por receptores de adhesión que se unen a ligandos presentes en otras células o en la matriz extracelular. Las moléculas de adhesión pertenecen a tres grupos principales: las selectinas, las integrinas y componentes de la superfamilia de las inmunoglobulinas.

Las integrinas son una familia de receptores transmembrana heterodiméricos que median interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, tanto en situaciones fisiológicas como patológicas^{20,28,29}. Cada integrina consta de una subunidad α y una subunidad β asociadas de forma no covalente. En mamíferos existen 18 subunidades α y 8 β que se combinan para dar lugar a 24 dímeros $\alpha\beta$ (**Figura 2**). Las integrinas son cruciales para el desarrollo y la homeostasis de los organismos multicelulares, así como en la recirculación linfocitaria durante la respuesta inmune^{24,30,31}.

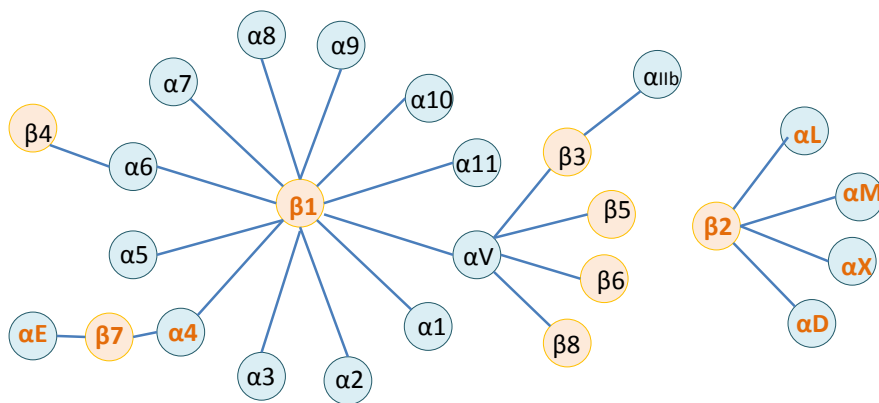


Figura 2. La familia de las integrinas. Cada integrina está formada por la heterodimerización de una subunidad α y otra β . Las integrinas expresadas en los leucocitos están señaladas en rojo.

2.1 Estructura de las integrinas

Las integrinas poseen un largo **dominio extracelular** (aproximadamente 800 aminoácidos) que media la unión con sus ligandos, un **dominio transmembrana** (20 aa), y una **cola citoplasmática** corta (de 13 a 70 aa). Estos tres dominios participan en la regulación de la afinidad de las integrinas. Los dominios extracelulares de las subunidades α y β conforman un dominio de unión

a ligando que se mantiene unido a través de interacciones no covalentes. La subunidad α contiene 7 dominios β -propeller que forman la cabeza, un dominio *thigh*, y dos dominios *calf*²⁰. La mitad de las subunidades α contienen un dominio I (o dominio A), que se sitúa en el sitio de unión a ligando (**Figura 3**). El dominio I posee un sitio conservado dependiente de ión metálico (MIDAS), que une cationes divalentes requeridos para la unión del ligando a las integrinas. La subunidad β está compuesta por un dominio híbrido que se une al dominio β I, un dominio PSI (plexina/semaforina/integrina), cuatro dominios EGF y un dominio proximal a la membrana denominado β TD. En las integrinas sin dominio I, los ligandos se unen a una grieta entre la conexión de las subunidades α y β , donde interaccionan con el ión metálico del sitio MIDAS en la subunidad β , y con el dominio *propeller* de la subunidad α ³¹⁻³⁴.

La asociación entre las estructuras en hélice de los dominios transmembrana (TMD) de las subunidades α y β conduce a un estado de baja afinidad de las integrinas (**Figura 3**)³⁵. Así, α y β forman interacciones electroestáticas que son desestabilizadas cuando diferentes proteínas activadoras interaccionan con las colas citoplásmicas de la subunidad β , aumentando el ángulo de inclinación del dominio transmembrana de esta subunidad.

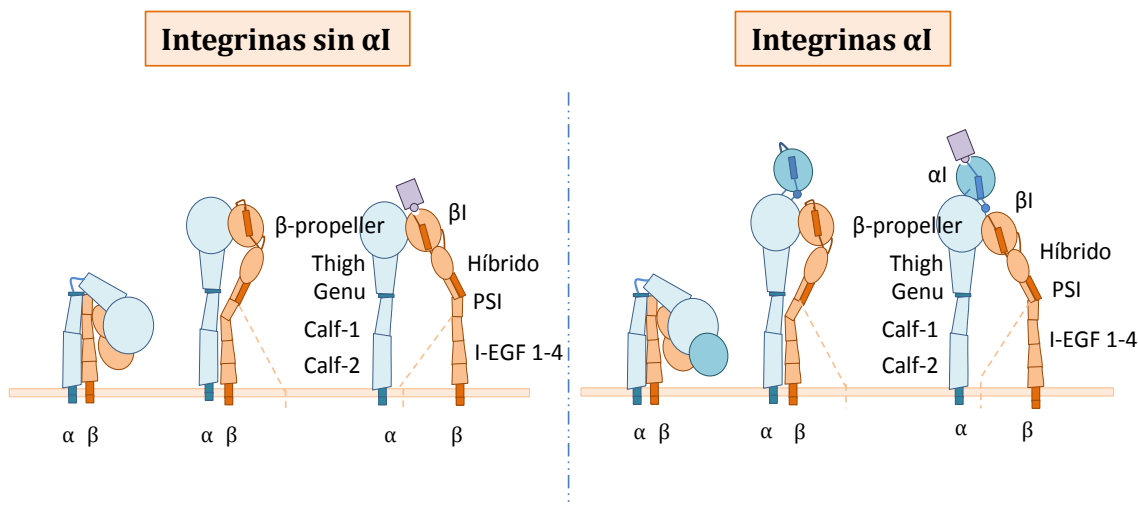


Figura 3. Estructura de las integrinas. Se muestran las diferentes conformaciones asociadas a distintas afinidades: baja afinidad o conformación doblada (izquierda), conformación extendida de afinidad intermedia (medio) y estado de alta afinidad con las colas citoplásmicas separadas entre sí (derecha). Adaptado de Springer and Dustin 2012³⁶.

Existe una gran similitud en las secuencias de las colas citoplásmicas entre diferentes subunidades α , especialmente en la región proximal a la membrana donde se encuentran las secuencias GFFKR. Esto sucede asimismo en las regiones próximas al motivo conservado HDR(R/K)E de las colas citoplásmicas de las distintas subunidades β . Los dominios citoplásmicos de las subunidades β contienen dos motivos bien definidos, NPxY (membrana proximal) y NxxY (membrana distal), los cuales constituyen sitios de unión para diferentes proteínas que regulan la activación de las integrinas³⁷⁻³⁹.

Las integrinas pueden expresarse en la membrana celular en tres estados: la conformación de baja afinidad, en la que el ectodominio está plegado sobre sí mismo; la conformación extendida intermedia; y la conformación extendida de alta afinidad⁴⁰⁻⁴² (**Figura 3**). Hay dos modelos propuestos: el primero señala que las integrinas extendidas unen ligando, mientras que el otro sugiere que la extensión de la integrina tiene lugar tras la unión a ligando. Ambos modelos señalan que los cambios conformacionales en el dominio de cabeza de las integrinas facilitan la unión al ligando⁴³⁻⁴⁵. Por otra parte, cuando las integrinas están en conformación inactiva, la interacción entre α y β es mantenida por un puente salino entre una arginina y un aspártico de las colas citoplásmicas de las subunidades α y β , respectivamente^{40,46-48}. El estado de alta afinidad está asociado con la separación de las colas citoplásmicas α y β inducida por proteínas activadoras que se unen a las subunidades β , tales como la talina o las proteínas kindlin^{40,43} (**Figura 3**).

2.2 Regulación de la actividad de las integrinas. Señalización *inside-out* y *outside-in*

La actividad adhesiva de las integrinas está regulada por cambios en su **afinidad** y/o en su **avidez**^{24,26,32,42,43,49}. Mientras que la afinidad se relaciona con cambios en la conformación del dominio extracelular de las integrinas que estimulan las interacciones monoméricas integrina-ligando, las variaciones en la avidez comportan alteraciones de la valencia e involucran la difusión de las integrinas y su agrupación o *clustering* en la membrana celular. Esto permite finalmente la formación de interacciones multivalentes adhesivas estables entre las integrinas y sus ligandos, y favorece el anclaje de las integrinas al citoesqueleto de actina y posteriormente el *spreading* celular. Dicha estabilización supone un **reforzamiento de la adhesión** o *adhesion strengthening*.

La activación de las integrinas mediante cambios en su afinidad y avidéz por sus ligandos puede proceder tanto de estímulos intracelulares como extracelulares. El primer caso constituye la **señalización *inside-out*** (**Figura 4**), la cual finaliza con la unión de moléculas intracelulares a la cola citoplásmica de las subunidades β tras la señalización procedente de receptores de superficie celular, como el receptor de células T (TCR), el receptor de células B (BCR) o los receptores de quimioquinas. Dicha unión conlleva cambios conformacionales en las integrinas que conducen a un incremento de su afinidad, y promueve el reforzamiento de la adhesión y la migración celular. Por otra parte, la unión de las integrinas a sus ligandos o a moléculas antagonistas, como anticuerpos estimuladores⁵⁰, o la exposición de células a PMA (Forbol 12-miristato 13-acetato) o a iones como Mn^{2+} , Mg^{2+} o Ca^{2+} ^{40,49,51}, se traduce en la transmisión de información hacia el interior de la célula mediante la **señalización *outside-in*** (**Figura 4**). La unión de ligandos extracelulares cambia asimismo la conformación de las integrinas y contribuye al ***clustering*** de las mismas. La señalización *outside-in* controla la polaridad celular, la dinámica del citoesqueleto de actina, la expresión génica, y la supervivencia y proliferación celular. Los procesos de señalización *inside-out* y *outside-in*, conceptualmente diferentes, están pese a todo estrechamente relacionados, y así contribuyen a la formación de la sinapsis inmunológica, a la estabilización del contacto entre célula T y APC, y a la proliferación celular y secreción de citoquinas^{40,52}.

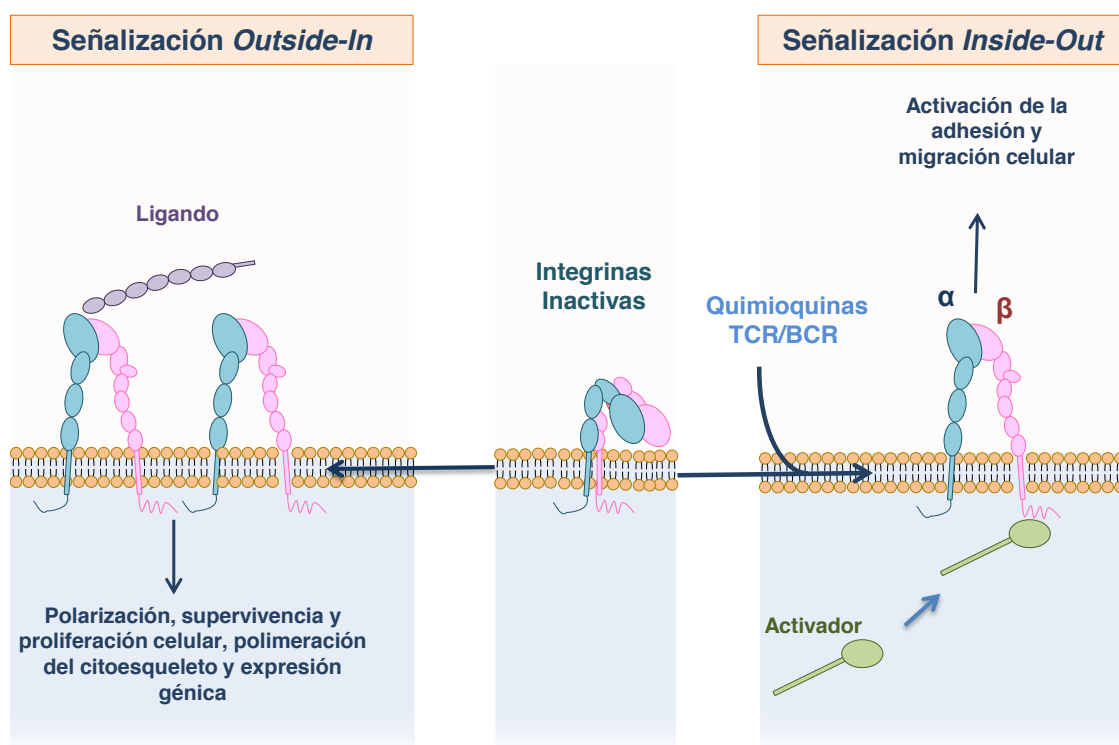


Figura 4. Señalización *Outside-in* e *Inside-out*. Durante la señalización *outside-in*, las integrinas transmiten señalización hacia el interior celular tras la interacción con sus ligandos. En la señalización *inside-out*, en respuesta a señalización procedente de receptores de la membrana celular, diferentes activadores celulares se unen a los dominios citoplásmicos de las integrinas, desencadenando cambios conformacionales que resultan en un aumento de la afinidad por sus ligandos. Adaptado de Shattil 2010⁴⁰.

2.3 Proteínas que regulan la activación de las integrinas: talina, kindlin e ICAP-1

Como ya se ha mencionado, la activación de las integrinas es principalmente regulada a través de la asociación de proteínas activadoras o inhibidoras con las regiones **NPxY** proximal a la membrana y **NxxY/F** distal a la membrana³² del dominio citoplásmico de las subunidades β . La fosforilación en los residuos tirosina de estos motivos inhibe directamente su unión al dominio PTB de las proteínas activadoras talina y kindlin, debido a un impedimento estérico del grupo fosfato⁵³. Por otra parte, la unión de migfilina o Krit1 (CCM1) a los inhibidores de integrinas filamina y ICAP-1, respectivamente, previene la unión directa de estos inhibidores, y por tanto favorece activación de las integrinas (**Figura 5**).

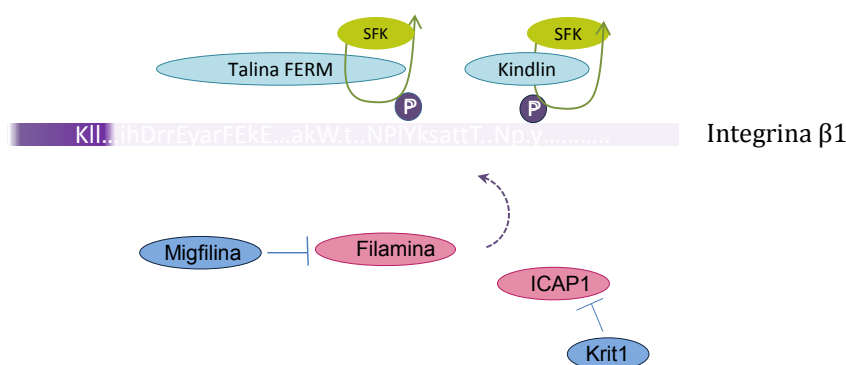


Figura 5. Proteínas intracelulares que se unen al dominio citoplasmático de las subunidades β y regulan la activación de las integrinas. Los activadores de la integrina se muestran en turquesa y los inhibidores en rosa. Talina y kindlin se pueden unir de forma simultánea. Sin embargo, los sitios de unión para estas proteínas y para los inhibidores posiblemente se solapan, sugiriendo que sólo uno se puede unir cada vez. Basado en Calderwood, 2013³⁵.

2.3.1 Talina

La talina es una proteína clave en la activación de las integrinas y juega un papel esencial en los procesos de formación de las adhesiones focales, *spreading*, migración y proliferación celular³². Es considerada un nexo de unión entre el citoesqueleto de actina, las integrinas y un amplio rango de ligandos intracelulares^{47,54,55}.

En vertebrados hay dos genes que codifican dos isoformas similares de talina, con funciones diferentes aunque solapantes³⁵. La **talina 1** está implicada en adhesión celular y *spreading*⁵⁶ y es requerida para la agregación plaquetaria y formación de trombos^{57,58}, así como para la angiogénesis embrional⁵⁹. La talina 2 se expresa principalmente en corazón⁶⁰, y al igual que la talina 1, se requiere para la fusión de mioblastos⁶¹.

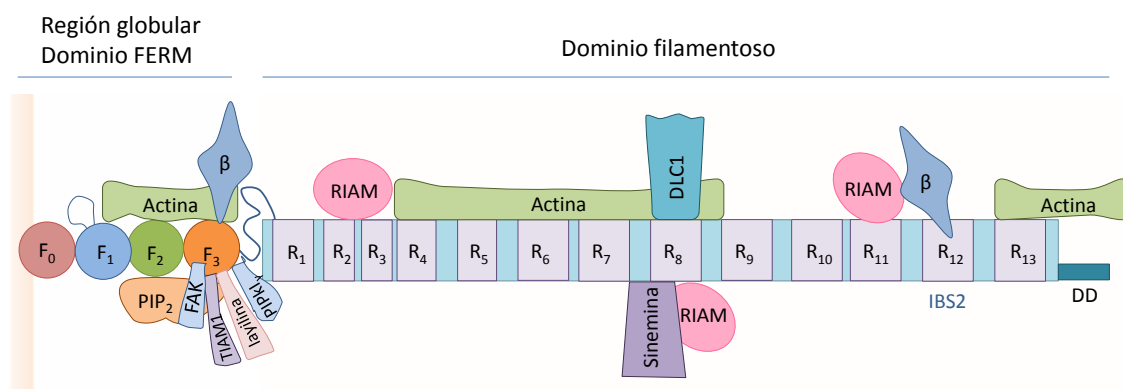


Figura 6. Organización en dominios de Talina. El extremo N-terminal de talina contiene un dominio FERM, el cual se une al motivo NPxY de las subunidades β . Dicho dominio continúa con el dominio filamentososo (R, rod) a través de una región peptídica sin estructura. En el dominio filamentososo existen dos sitios de unión a actina y múltiples sitios de unión a vinculina (VBSs), así como un segundo sitio de unión a la integrina o IBS2⁶². Asimismo, este dominio contiene varios sitios de unión a RIAM, una proteína involucrada en la activación y reclutamiento de talina a la membrana. Se indican asimismo los sitios de interacción con otras proteínas. En el extremo C-terminal existe un dominio de dimerización de talina (DD). Basado en Calderwood, 2013³⁵.

La talina está formada por un dominio globular N-terminal (*talin head*) y un dominio filamentososo C-terminal (R, rod) (Figura 6). Como se ha señalado anteriormente, la unión de la talina a las integrinas en su estado inactivo provoca la separación espacial de las colas citoplásmicas de las subunidades α y β ⁴⁹. Esto es debido a la interrupción por la talina de la interacción de un puente salino entre el residuo Arg del motivo GFFKR de la subunidad α y el Asp del motivo HDRK de la subunidad β ^{63,64} que mantiene a integrinas en la conformación inactiva. La unión simultánea de talina a los fosfolípidos de membrana y al motivo NPxY de las colas citoplásmicas de las integrinas provoca un aumento del ángulo de inclinación del dominio transmembrana de la subunidad β . Esto desestabiliza asimismo las interacciones entre las subunidades α y β contribuyendo a la separación de las colas citoplásmicas y al cambio a una conformación de alta afinidad de las integrinas mediante la activación *inside-out*^{40,65,66}.

2.3.2 Modelo de reclutamiento de talina a la membrana celular

Este modelo propone que la talina se encuentra en una conformación autoinhibida con su región de unión a integrina (dominio F3 en la región globular) bloqueada por su unión intramolecular con el dominio filamentososo (R9)⁶⁷. Tras la estimulación celular, la talina se localiza rápidamente en la membrana celular. Este

evento es dependiente de la interacción de talina con el complejo **RIAM-RAP1A-GTP** ^{68,69} y es facilitado por su unión a **PIP₂** y **PIPKI γ** (el enzima encargado de producir PIP₂) a través de residuos positivos presentes en el dominio globular de talina. Esto se traduce en la rotura de la unión intramolecular inhibitoria, y en activación de la talina, la cual aumenta su afinidad por las colas citoplásmicas de las integrinas β (**Figura 7**).

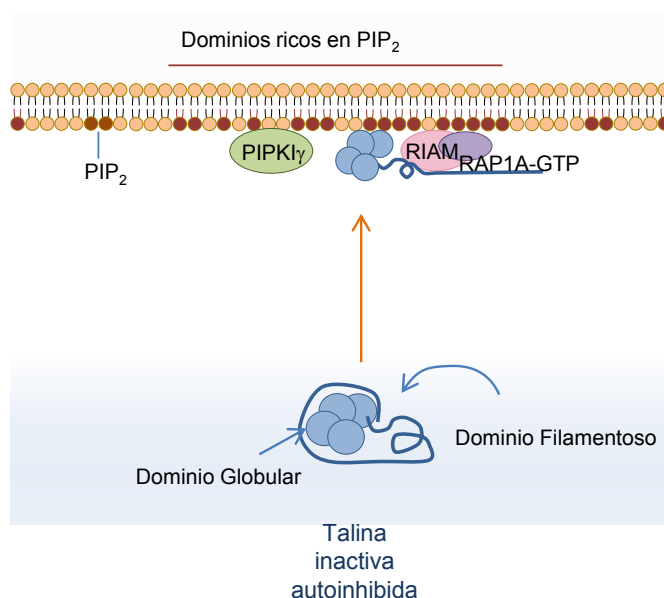


Figura 7. Modelo de reclutamiento y activación de talina en la membrana celular. Este modelo muestra como la talina autoinhibida en el citosol es reclutada a los microdominios de PIP₂ en la membrana, lo cual está facilitado por su unión al complejo RIAM-RAP1A-GTP a través del dominio filamentoso, así como por su unión a PIPKI γ . Basado en Calderwood, 2013³⁵.

2.3.3 Kindlin

Aunque la talina es un activador esencial de las integrinas, se ha demostrado que las proteínas kindlin cooperan con la talina para una activación más eficiente de las integrinas⁷⁰. El complejo talina-kindlin-integrina tiene una vida media muy corta por sí sólo, pero puede estabilizarse tras la interacción integrina-ligando⁷¹. El subdominio F3 de las proteínas kindlin se une a los motivos distales NPxY de las subunidades $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$, lo cual no solapa con los sitios de unión de talina, pero sí con filamina⁷², con proteínas 14-3-3⁷³ y con *sorting nexin* 17⁷⁴ (**Figura 8**). Existen tres parálogos de kindlin en vertebrados llamados kindlin-1, kindlin-2 y kindlin-3⁷⁵, que exhiben diferente expresión génica en humanos, a pesar de compartir una estructura y secuencia similar⁷⁶. Kindlin-3 se expresa

preferentemente en el sistema hematopoyético⁷⁷, aunque su expresión en células endoteliales ha sido también descrita⁷⁸. En leucocitos, kindlin-3 coopera con la talina durante la activación de $\alpha 4\beta 1$ y LFA-1, siendo importante su función en la adhesión en condiciones de flujo en neutrófilos, células B, células T CD4 y células T efectoras⁷⁹⁻⁸¹.



Figura 8. Las proteínas Kindlin contiene un dominio FERM similar a talina, con subdominios F0, F1, F2 y F3, pero presentan una región PH insertada en el subdominio F2. Se ha propuesto que el subdominio F3 es el responsable de la unión de kindlin al motivo distal NPxY de las subunidades β . Basado en Fagerholm et al, 2014⁸².

Se ha observado que los neutrófilos deficientes en talina o en kindlin-3 no son capaces de adoptar la conformación de alta afinidad de LFA-1, mientras sólo los deficientes en talina son incapaces de activar la integrina al estado intermedio de activación. Recientemente se ha mostrado que la interacción de integrinas $\beta 2$ con talina y kindlin no es completamente necesaria para la migración o el *rolling* mediado por estas integrinas sobre ICAM-1 en condiciones de flujo⁷⁹.

2.3.4 ICAP-1

ICAP-1, *Integrin Cytoplasmic Domain-Associated Protein-1*, es una proteína expresada tanto en el citoplasma como en núcleo⁶², con una amplia distribución tisular, y que constituye un regulador negativo para las integrinas $\beta 1$ ⁸³. Notablemente, el sitio de unión de ICAP-1 al dominio citoplásmico de la subunidad $\beta 1$ compite potencialmente con la interacción de talina y kindlin con dicho dominio^{47,84-86}.

El gen *Icap-1* está localizado en el cromosoma 2 en humanos y en el 12 en ratones. En humanos, dicho gen es transcrito en dos RNA mensajeros debido a *splicing* alternativo, presentando dos isoformas: ICAP-1 α , de 200 aminoácidos, al que a partir de ahora se referirá como ICAP-1, y ICAP-1 β , de 150 aminoácidos. Mediante el análisis de la estructura genómica, se identificó que el exón 6 es la región donde se realiza el *splicing*⁸⁷, la cual contiene la región de interacción al

motivo NPxY de la subunidad $\beta 1$. ICAP-1 β es incapaz de unirse a $\beta 1^{87,88}$, y su función es desconocida⁸⁹.

El dominio N-terminal de ICAP-1 (1-60 aa) es rico en serinas/treoninas y contiene diferentes sitios consenso de fosforilación por proteínas quinasas como PKC, PKA/PKG, PAKs y CaMKII⁸⁹ (**Figura 9**). En la región C-terminal (61-200 aa), ICAP-1 posee un dominio de unión a fosfotirosina PTB, a través del cual se une tanto al motivo NPxY de $\beta 1^{90}$ ya mencionado, como a CCM1^{89,91} (también conocida como Krit1). De este modo, $\beta 1$ y CCM1 compiten por la unión a ICAP-1⁹²⁻⁹⁴. La especificidad en la interacción de ICAP-1/ $\beta 1$ se atribuye al requerimiento adicional al NPxY del residuo de valina 787 en $\beta 1^{87}$ (**NPIYKSAVTTVV**). Además de $\beta 1$ y CCM1, se ha mostrado que ICAP-1 puede unirse a las GTPasas Cdc42 y Rac1^{87,88}.

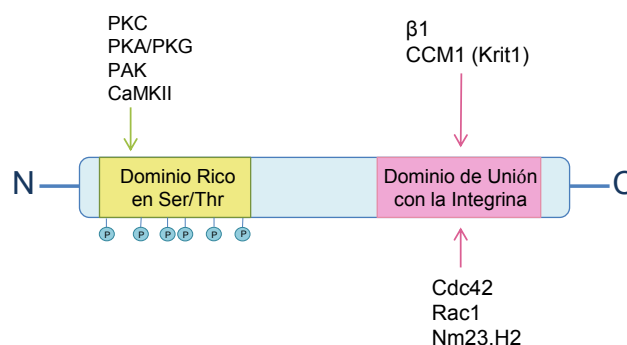


Figura 9. Estructura de ICAP-1 α . El dominio N-terminal rico en serinas y treoninas contiene distintos sitios de fosforilación. En la región C-terminal se encuentra un dominio PTB, a través del cual se une a $\beta 1$. Basado en Kim et al, 2011; Zhang et al, 1999; Millon-Frémillon et al, 2013⁹⁴⁻⁹⁶.

ICAP-1 es fosforilada durante el proceso de adhesión celular⁸⁷. La fosforilación de ICAP-1 por parte de CaMKII interrumpe un enlace entre los dominios N- y C-terminal de ICAP-1. Esto permite la interacción de la región PTB de ICAP-1 con el dominio citoplasmático de $\beta 1$, lo que modula la activación de $\beta 1$ e inhibe el ensamblaje de adhesiones focales⁹⁶.

ICAP-1 no se ha detectado en las adhesiones focales, lugar de *clustering* de las integrinas. De hecho, la sobre-expresión de ICAP-1 conlleva la desorganización y eliminación de adhesiones focales dependiente de integrinas $\beta 1$, y aumenta la movilidad celular⁹⁷. Estos resultados sugieren que la desorganización de las adhesiones focales por ICAP-1 se traduce en inhibición de la adhesión celular, debido probablemente a la interferencia en la unión de talina a $\beta 1$, con el consiguiente bloqueo de la activación de estas integrinas⁸⁶.

ICAP-1 posee asimismo una secuencia de localización nuclear (NLS) KKRH en el dominio N-terminal, la cual está rodeada de residuos de glicina⁹⁷. La localización nuclear de ICAP-1 está regulada por la actividad de integrinas $\beta 1$, siendo dependiente del estado de *spreading* celular sobre fibronectina⁹⁷. Adicionalmente, ICAP-1 promueve proliferación celular, lo cual es dependiente de su localización nuclear y de la adhesión celular a fibronectina. La regulación de la proliferación celular por ICAP-1 ha sido correlacionada con su capacidad de activar los promotores p1 y p2 de c-myc^{89,97,98}. Finalmente, la localización nuclear de ICAP-1 ha sido implicada en la regulación de la formación de complejos de proteínas en los que están incluidos CCM1 y CCM2⁹⁹.

Los ratones deficientes en ICAP-1 no exhiben letalidad embrionaria, aunque alrededor de un 20% de la población muere al nacer. Esta mortalidad perinatal podría ser causada por falta de alimentación, ya que se ha observado que a menudo los recién nacidos ICAP-1 $-/-$ no tienen leche en su estómago⁸⁵. Dichos ratones tienen un fenotipo de enanismo moderado y dismorfismo craneofacial, debido a la función alterada de los osteoblastos y la retrasada mineralización del hueso. Notablemente, los osteoblastos de los ratones ICAP-1 $-/-$ presentan una mayor activación de la integrina $\beta 1$ que los osteoblastos de ratones *wild type*⁸⁵.

2.4 La integrina $\alpha 4 \beta 1$ y sus ligandos

La integrina $\alpha 4 \beta 1$ (VLA-4) juega un papel clave en la hematopoyesis, en el tráfico leucocitario durante la vigilancia inmunitaria, y en procesos inflamatorios^{9,100,101}. En la hematopoyesis, $\alpha 4 \beta 1$ está implicada en la adhesión de progenitores hematopoyéticos al estroma de la médula ósea¹⁰², requiriéndose su función para el correcto desarrollo de progenitores de linfocitos B y T en médula¹⁰³. En ratones condicionales para la expresión de $\alpha 4$ se observó que su falta provoca la acumulación de progenitores hematopoyéticos en sangre y bazo¹⁰⁴. Además de en progenitores hematopoyéticos, $\alpha 4 \beta 1$ se expresa principalmente en progenitores hematopoyéticos, linfocitos, monocitos, basófilos, eosinófilos, mastocitos^{100,105}. Igualmente, es capaz de expresarse en células de la cresta neural^{106,107}, así como en células tumorales de origen no hematopoyético como el melanoma^{108,109}.

$\alpha 4 \beta 1$ juega un papel importante en patologías inflamatorias como

esclerosis múltiple, aterosclerosis, asma bronquial y contribuye a la progresión de artritis reumatoide^{100,105}. Asimismo, juega un papel clave en la localización de células de mieloma múltiple¹¹⁰⁻¹¹³, de leucemia linfocítica crónica B¹¹⁴⁻¹¹⁶ y de leucemia mieloide crónica¹¹⁷ en la médula ósea. Los principales ligandos de $\alpha 4\beta 1$ son VCAM-1 y el segmento CS-1 de la región III-CS de la molécula de fibronectina, los cuales se describen a continuación.

- **VCAM-1** (*vascular cell adhesion molecule-1* o CD106):

Es una glicoproteína de membrana perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas que se expresa en células endoteliales activadas de cordón umbilical¹¹⁸, en vénulas de endotelio alto de ganglios linfáticos periféricos y mesentéricos, en la microvasculatura medular, en células estromales de médula ósea, en células epiteliales tímicas de la corteza y zona córtico-medular del timo, en macrófagos del bazo, y en células dendríticas¹¹⁹⁻¹²¹. La expresión de VCAM-1 puede inducirse por diversas citoquinas, como TNF- α , IL-1, IL-4 e IL-13^{118,122-124}. Estructuralmente, está formada por 7 repeticiones de dominios de inmunoglobulina, aunque puede ser asimismo expresada en formas de 3, 6 u 8 dominios como consecuencia de *splicing* alternativo¹²⁵. Los dominios 1 y 4 son los responsables de la unión a $\alpha 4\beta 1$ (**Figura 10A**). La interacción $\alpha 4\beta 1$ /VCAM-1 contribuye principalmente a la adhesión firme de los leucocitos sobre el endotelio, si bien puede estar asimismo implicada en los fenómenos iniciales de adhesión transitoria y rodamiento (*rolling*). La sobreexpresión de VCAM-1 ha sido asociada con diversas patologías inflamatorias y en autoinmunidad, como la aterogénesis, asma, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, apendicitis y dermatitis¹²⁶⁻¹²⁹. Los ratones homocigóticos para la delección de VCAM-1 mueren durante la embriogénesis. Los ratones con deficiencia condicional de esta glicoproteína en el sistema hematopoyético presentan un número reducido de células B maduras en médula, así como una capacidad muy limitada para reclutar linfocitos B y T a la médula ósea, denotando así un papel fundamental de VCAM-1 en el desarrollo de células B y en los procesos de migración linfocitaria a la médula ósea¹³⁰.

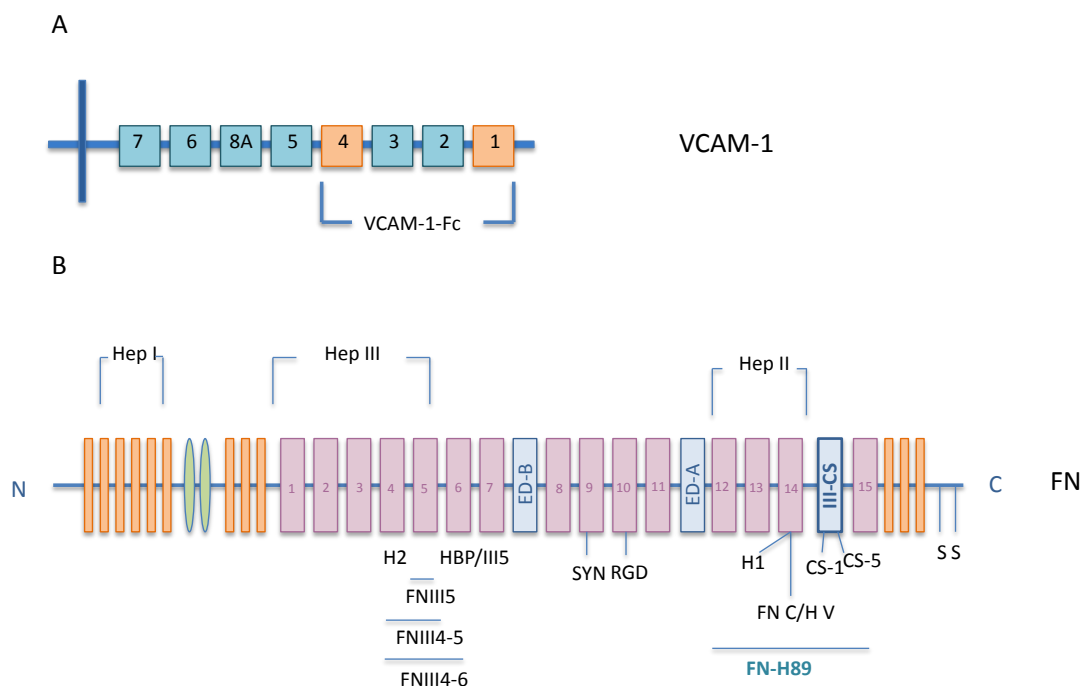


Figura 10. Estructura de VCAM-1 y fibronectina. (A) Esquema de la forma transmembrana de VCAM-1, con 8 dominios de tipo inmunoglobulina. Los dominios de interacción con $\alpha 4\beta 1$ son el 1 y 4 (resaltados en naranja). En este trabajo se han utilizado formas recombinantes solubles de VCAM-1 humano y de ratón (VCAM-1-Fc), que contienen los dominios del 1 al 4 fusionados con la región Fc de la IgG1 humana. (B) Esquema de una de las cadenas de la fibronectina, con sus dominios estructurales. En el extremo C-terminal aparece el dominio III-CS en el que se encuentra el motivo CS-1 de alta afinidad para la unión de $\alpha 4\beta 1$. El fragmento recombinante FN-H89 utilizado en este trabajo está resaltado en color azul, y contiene el motivo CS-1 del dominio III-CS.

• Fibronectina:

La fibronectina es una glicoproteína de 450 kDa presente tanto en la matriz extracelular como soluble en plasma y otros fluidos. Está formada por dos cadenas polipeptídicas A y B, que se originan por *splicing* alternativo y que están unidas por puentes disulfuro en sus extremos carboxilo-terminales. La fibronectina está compuesta por repeticiones de tres tipos de homología estructural I, II y III, que contienen sitios de unión a macromoléculas como fibrina, heparina, proteoglicanos, o a células. La fibronectina interacciona con $\alpha 4\beta 1$ fundamentalmente a través de dos regiopor el cual $\alpha 4\beta 1$ presenta baja afinidad y para cuyo reconocimiento se requiere la conformación activa¹³¹ (Figura 10B). Por otro lado, en la región central de la molécula está el motivo RGD, capaz de unir las integrinas $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha V\beta 3$ ^{132,133}.

3. Las quimioquinas y sus receptores

El reclutamiento de los leucocitos a sitios de inflamación mediado por moléculas quimioatrayentes juega un importante papel en la respuesta inmune. Las quimioquinas son mediadores críticos en la migración leucocitaria durante la vigilancia inmunitaria, inflamación y desarrollo. Constituyen una familia de citoquinas de bajo peso molecular (8-14 kDa) que inicialmente fueron descritas por su función quimioatrayente para poblaciones leucocitarias específicas¹³⁴⁻¹³⁶. Sin embargo, actúan asimismo sobre distintos tipos celulares, y juegan un papel importante en el desarrollo del sistema nervioso¹³⁷, angiogénesis^{17,138} e invasión y metástasis de células tumorales^{134,135,139,140}. Las quimioquinas son fundamentales durante la hematopoyesis¹⁴¹, y estimulan señales intracelulares implicadas en activación celular^{142,143}, y en la adhesión celular mediada por integrinas^{14,17,23,144,145}. Asimismo, regulan la diferenciación de linfocitos T y la respuesta Th1/Th2¹⁴³.

Las quimioquinas poseen entre sí una alta homología estructural, presentando cuatro residuos de cisteína altamente conservados en su extremo amino-terminal, los cuales forman un puente disulfuro entre la primera y tercera cisteína, y otro puente entre la segunda y cuarta cisteína¹³⁵ (**Figura 11A**). Las quimioquinas y sus receptores han sido divididas en cuatro familias en base a la posición relativa de las dos cisteínas más próximas al extremo amino-terminal¹⁴⁶⁻¹⁴⁸ (**Figura 11B**): la familia **CC**, cuyos componentes presentan ambas cisteínas contiguas; **CXC**, con un aminoácido entre las cisteínas; **C**, que presentan un único residuo de cisteína; y **CX3C**, con tres aminoácidos entre las cisteínas^{135,149,150}. Las quimioquinas CXC se han subdividido a su vez en **ELR+** (CXCL1-8) y **ELR** (CXCL9-16), según la presencia del motivo Glu-Leu-Arg anterior al primer residuo de cisteína (**Tabla 1**).

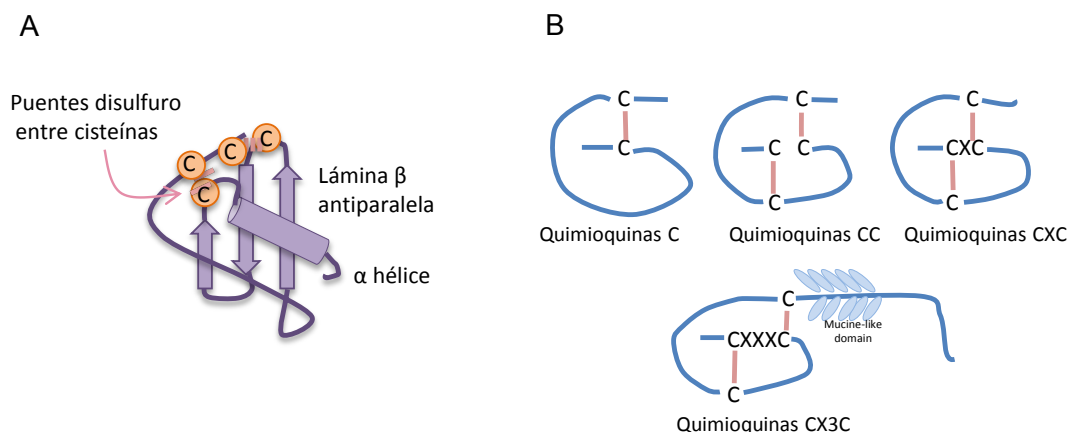


Figura 11. Estructura de las quimioquinas. (A) Esquema de la estructura de una quimioquina. (B) Las quimioquinas han sido divididas en cuatro familias, en base a la posición relativa de las dos cisteínas más próximas al extremo amino-terminal.

Otra clasificación de las quimioquinas está basada en criterios funcionales. Así, las quimioquinas **inflamatorias** (o inducibles), cuya expresión aumenta en condiciones inflamatorias, están especialmente implicadas en el reclutamiento leucocitario a tejidos inflamados. Las quimioquinas **homeostáticas** están constitutivamente expresadas en órganos linfoides y otros órganos, y participan en la migración homeostática de distintos tipos celulares¹⁵¹⁻¹⁵³. Sin embargo, esta clasificación no es estricta, debido a que la expresión de ciertas quimioquinas constitutivas puede ser regulada por diversos estímulos según el contexto biológico o estado patogénico, y por ello se denomina a este tercer grupo quimioquinas con función dual¹⁴⁹. La expresión de las quimioquinas inducibles es a menudo desencadenada por mediadores inflamatorios como $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, productos microbianos o traumáticos, lo que posibilita el reclutamiento y activación de determinadas poblaciones leucocitarias¹³⁶. Estas quimioquinas actúan tanto sobre las células de la inmunidad innata como sobre las células de inmunidad adaptativa, siendo su expresión temporal¹⁵¹. Por otro lado, las quimioquinas homeostáticas coordinan un nivel basal de migración celular necesario para una correcta función del sistema inmune. Asimismo, intervienen en la migración de las células T y B a través de áreas especializadas de órganos linfoides secundarios, y durante la vigilancia inmunitaria en zonas en constante exposición al medio externo, como los pulmones, la piel y la mucosa del intestino¹⁴¹. Las quimioquinas se caracterizan por su **redundancia** y **promiscuidad entre ligandos y receptores**, de modo que una quimioquina

puede unirse a varios receptores, mientras que un único receptor puede transducir señales para distintas quimioquinas, aunque siempre manteniéndose la especificidad de familia. Esto refleja la capacidad de las quimioquinas para regular diferentes poblaciones leucocitarias, especialmente en complejos contextos como la respuesta inflamatoria aguda y la crónica. Sin embargo, la redundancia no es una cualidad general de las quimioquinas, ya que pueden exhibir una gran **especificidad** en cuanto a su expresión en tejido y receptor^{150,154}.

Nombre Sistemático	Nombre común	Receptor	Nombre Sistemático	Nombre común	Receptor
Familia CC			Familia CXC		
CCL1	I-309	CCR8	CXCL1	GRO- α	CXCR2, CXCR1
CCL2	MCP-1	CCR2	CXCL2	GRO- β	CXCR2
CCL3	MIP-1 α	CCR1, CCR5	CXCL3	GRO- γ	CXCR2
CCL4	MIP-1 β	CCR5	CXCL4	PF4	CXCR3 β
CCL5	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5	CXCL4L	PF4V1	CXCR3
CCL7	MCP-3	CCR1, CCR2, CCR3	CXCL5	ENA-78	CXCR2
CCL8	MCP-2	CCR3	CXCL6	GCP-2	CXCR1, CXCR2
CCL11	Eotaxin	CCR3	CXCL7	NAP-2	CXCR2
CCL13	MCP-4	CCR2	CXCL8	IL-8	CXCR1, CXCR2
CCL14	HCC-1	CCR2, CCR3	CXCL9	MIG	CXCR3
CCL15	HCC-2	CCR1, CCR2, CCR3	CXCL10	IP-10	CXCR3
CCL16	LEC	CCR1	CXCL11	ITAC	CXCR3, CXCR7
CCL17	TARC	CCR4	CXCL12	SDF-1 α , SDF-1 β , SDF-1 γ	CXCR4, CXCR7
CCL18	PARC	Desconocido	CXCL13	BLC	CXCR5
CCL19	ELC	CCR7	CXCL14	BRAX	Desconocido
CCL20	MIP-3 α	CCR6	CXCL16	SR-PSOX	CXCR6
CCL21	SLC	CCR7	CXCL17	DMC	Desconocido
CCL22	MSD	CCR4	Familia C		
CCL23	MIPF-1	CCR1	XCL1	Lymphotactin	XCR1
CCL24	Eotaxin-2	CCR3	XCL2	SCM-1 β	XCR1
CCL25	TECK	CCR9	Familia CX3C		
CCL26	Eotaxin-3	CCR3	CX3CL1	Fractalkine	CX3CR1
CCL27	ILC	CCR10			
CCL28	MEC	CCR3, CCR10			

Tabla 1. Clasificación de las quimioquinas en diferentes familias. Se han clasificado de acuerdo a su función, diferenciándose en **homeostáticas**, **inflamatorias**, con **función dual** o de expresión en **plasma o plaquetas** (Nomiya et al., 2013¹⁵⁴) En este trabajo se ha estudiado principalmente el papel de la quimioquina CXCL12 y su receptor CXCR4 (recuadrados en azul) en la adhesión de células T dependiente de la integrina $\alpha 4\beta 1$.

Un número importante de quimioquinas CC y CXC forman **homodímeros** y **homo-oligómeros** de alto orden en solución o unidos a glicosaminoglicanos^{15,155-157}. Las quimioquinas pertenecientes a la misma subfamilia y que presentan alta homología en su secuencia de plegamiento y en los motivos de dimerización pueden igualmente hetero-oligomerizar¹¹⁰.

Las quimioquinas se unen a receptores de membrana acoplados a proteínas G heterotriméricas (**GPCR**: *G-protein coupled receptor*), causando cambios conformacionales en el receptor que desencadenan la activación de diferentes vías de señalización implicadas en activación celular. Dichos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores de siete dominios transmembrana (7TM)^{136,158}. Estos receptores constan de una única cadena proteica de unos 350 aminoácidos que cruza siete veces la membrana celular, de modo que en la unión al ligando intervienen el dominio amino-terminal y los tres bucles extracelulares, mientras que el extremo carboxi-terminal y los bucles intracelulares intervienen en el acoplamiento de moléculas transductoras de señal¹⁵⁹ (**Figura 13**). Los cambios conformacionales en las regiones intracelulares provocados por la unión quimioquina-receptor favorecen el intercambio de GDP por GTP de las proteínas G heterotriméricas ($G\alpha\beta\gamma$). Tras la activación de la subunidad $G\alpha$ se produce su disociación del dímero $G\beta\gamma$, y dichas subunidades actúan de manera independiente sobre sus respectivas moléculas efectoras. Tras la hidrólisis del GTP mediada por la actividad GTPasa intrínseca de la subunidad $G\alpha$, ésta se une de nuevo al dímero $G\beta\gamma$ y la señalización finaliza^{158,160}. Los receptores **atípicos** o *decoy* (D6, DARC, CCRL1, CCRL2 y CXCR7) carecen de dominio DRY, y no señalizan vía $G\alpha_i$. No poseen actividad quimiotáctica y participan especialmente en el control de los niveles de quimioquinas en los tejidos o en su reciclaje (*scavenging*)¹⁴⁹.

La unión de las quimioquinas a sus receptores y la posterior activación de estos originan diferentes rutas de señalización mediadas por las distintas subunidades $G\alpha$ ($G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i}$, $G_{\alpha q}$ y $G_{\alpha 12}$ ¹⁶⁰) acopladas a estos receptores. Algunas de estas vías de señalización incluyen la ruta Jak/Stat, la vía de las MAP quinasas, la activación de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) y de la fosfolipasa C β (PLC β), así como la estimulación de diversos miembros de la familia de las Rho-GTPasas^{135,142} (**Figura 12**).

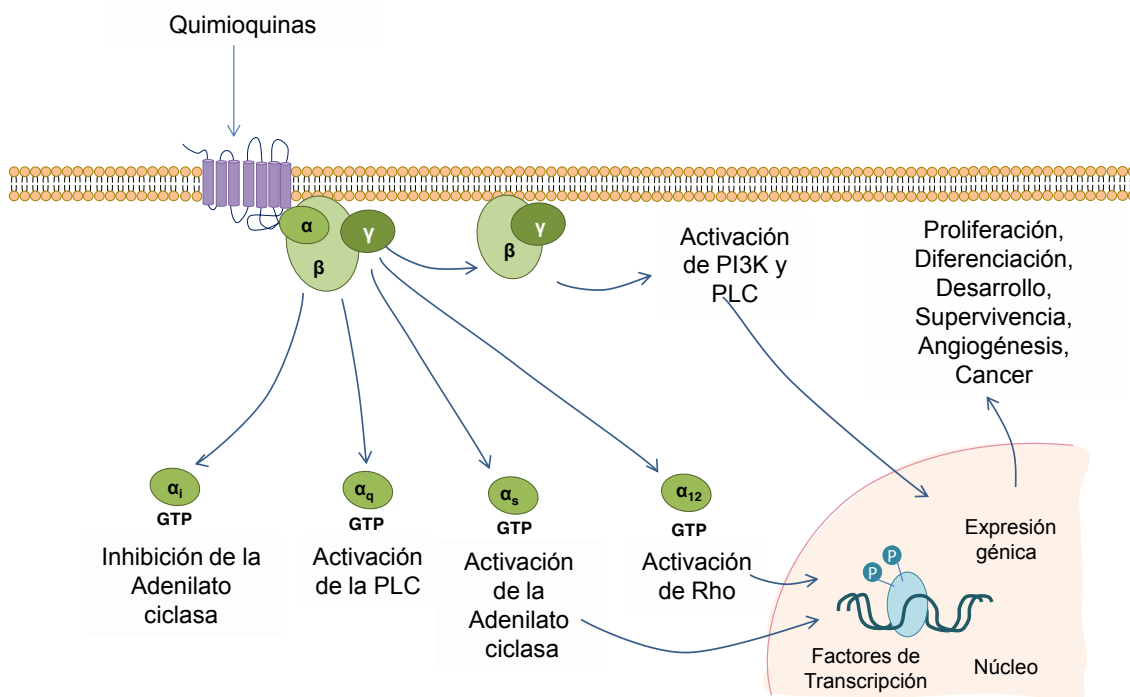


Figura 12. Vías de señalización intracelular estimuladas por las distintas subunidades G α acopladas a los receptores de quimioquinas.

Una de las características de la interacción quimioquina-receptor es su naturaleza transitoria, de modo que los receptores de quimioquinas son rápidamente desensibilizados y no responden a posteriores estimulaciones. La desensibilización de los receptores de quimioquinas está controlada por su fosforilación. Así, los dominios intracelulares de estos receptores son fosforilados por GRKs (*G-protein associated kinase*), permitiendo la unión de las β - arrestinas a los receptores fosforilados, lo cual conduce finalmente a la internalización y degradación de los receptores en los lisosomas^{161,162}. Otro modo de desensibilización es mediado por segundos mensajeros con función quinasa, como por ejemplo, la proteína quinasa A y la proteína quinasa C¹⁵⁸.

Como se ha apuntado anteriormente, los cambios en la afinidad y aidez de las integrinas proceden de señalización *inside-out*, la cual es fuertemente activada tras la interacción de los receptores de quimioquinas con sus ligandos, como es el caso del par CXCL12-CXCR4^{1,3,14,144,163} (**Figura 13**).

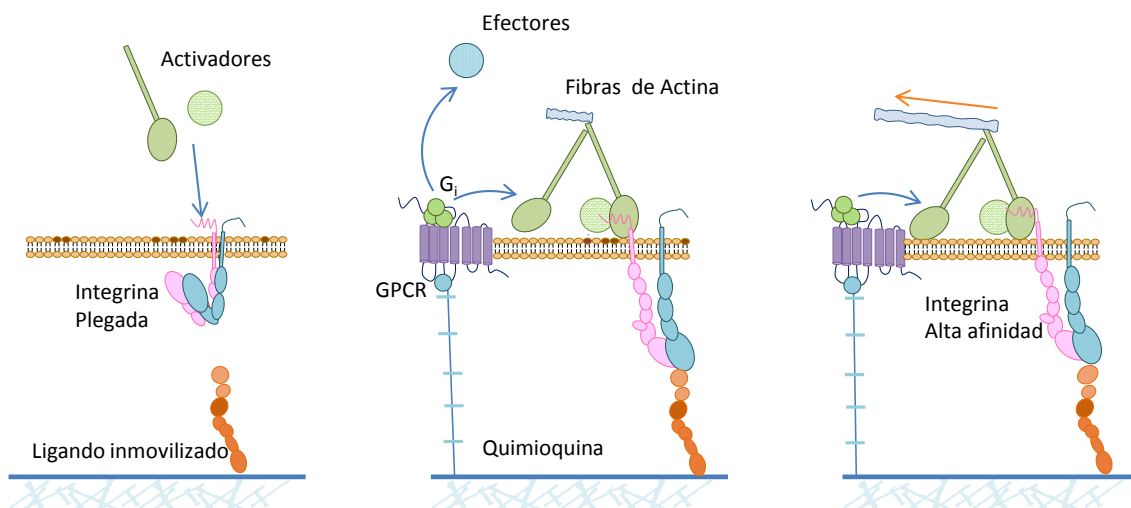


Figura 13. Activación de las integrinas por señalización *inside-out* estimulada por quimioquinas. Las integrinas leucocitarias se encuentran en un estado inactivo plegado en ausencia de estimulación (**izquierda**). Después de la interacción de la quimioquina con su receptor, las proteínas G_i desencadenan señales intracelulares que conllevan el reclutamiento hacia la membrana de proteínas activadoras (talina y kindlin-3) (**centro**). La interacción de éstas últimas con la subunidad β provoca cambios conformacionales en la integrina. La separación de las colas citoplásmicas conlleva la activación a un estado de alta afinidad de la integrina, la cual puede unir ligando (**derecha**). Basado en Alon, 2010⁷¹.

3.1 La quimioquina CXCL12 y sus receptores

CXCL12, también denominada **SDF-1** (*stromal cell-derived factor-1*), es una quimioquina CXC altamente conservada entre las especies humana y murina¹⁶⁴. El gen humano que codifica para CXCL12 se localiza en el cromosoma 10, y su mRNA puede dar origen a varias isoformas por *splicing* alternativo. Las principales isoformas de CXCL12 son α y β , de 89 y 93 aminoácidos, respectivamente. La isoforma CXCL12 α se expresa preferentemente en ganglios linfáticos, timo, pulmón, hígado y médula ósea, aunque también ha sido descrita su expresión en el intestino delgado, riñones, encéfalo o piel^{165,166}. Se conocen otras variantes de *splicing* resultantes de la adición de un exón diferente a los tres primeros exones compartidos con CXCL12 α y CXCL12 β : CXCL12 γ , CXCL12 ϵ , CXCL12 δ , y CXCL12 θ (también conocida como CXCL12 ϕ)^{167,168}. En este trabajo hemos utilizado la isoforma CXCL12 α , a la que a partir de ahora se referirá como CXCL12.

La estructura de CXCL12 fue determinada por espectroscopía RMN, lo que también permitió conocer que existe un equilibrio entre sus formas monomérica y dimerica muy sensible al pH¹⁶⁹. En la región amino-terminal existe un motivo CXC, seguido por un *loop* o lazo, 3 láminas β antiparalelas, y una hélice α en el extremo C-terminal^{164,170}. Los ocho primeros residuos N-terminales, junto con los residuos

del 12 al 17 en la región del lazo componen el dominio de unión al receptor, siendo los residuos 1 y 2 aquellos que están directamente involucrados con la activación del receptor¹⁷¹.

CXCL12 es un potente quimioatrayente para linfocitos naïve y de memoria B y T, y para monocitos y precursores hematopoyéticos, lo cual sugiere que está involucrado en procesos de homeostasis de las células del sistema inmune. Aunque la expresión de CXCL12 sea principalmente constitutiva, se ha demostrado que ésta puede ser regulada. Trabajos previos muestran que TGF- β 1 reduce la expresión de CXCL12 de células estromales de la médula ósea, lo que se traduce en alteraciones en la adhesión y migración de progenitores hematopoyéticos y células de mieloma múltiple¹⁷². Asimismo, TNF- α e IL-1 β disminuyen la expresión de CXCL12 en la médula ósea, lo cual contribuye a la movilización de linfocitos B y al aumento en la población de granulocitos¹⁷³. Por el contrario, se ha observado que el G-CSF, así como agentes causantes de daño en el ADN como la irradiación con luz UV, aumentan transitoriamente la expresión de CXCL12 en osteoblastos de médula ósea y en bazo^{174,175}.

El principal receptor de CXCL12 es **CXCR4** (o CD184), el cual juega papeles clave durante el desarrollo, la hematopoyesis y la vigilancia inmunitaria. CXCR4 es expresado en una amplia variedad de tipos celulares: linfocitos T y B, progenitores hematopoyéticos (CD34+), células endoteliales, monocitos y macrófagos, células dendríticas maduras y plaquetas^{165,176}. Asimismo, ha sido identificado como un correceptor crítico para la entrada de los virus HIV-1 y HIV-2 en los linfocitos T CD4+^{165,177}. Por otra parte, CXCR4 ha sido implicado en proliferación, invasión y metástasis de diversos tumores^{139,178-180}, por lo que el eje CXCL12-CXCR4 constituye una importante diana en terapias antitumorales^{181,182}.

Tras la unión CXCL12 a CXCR4 se activan las quinasas JAK2 y JAK3¹⁸³, y la transfosforilación en tirosinas de éstas y del propio receptor conlleva el reclutamiento de STAT y la exposición de motivos que permiten la unión de proteínas G heterotriméricas¹⁴². Como resultado de la unión CXCL12-CXCR4, numerosas vías de señalización mayoritariamente dependientes de G α i son activadas^{183,184}, entre las que se encuentra la fosforilación de Erk1/2, así como de diversos componentes de las adhesiones focales, tales como p130Cas, Pyk2, FAK (*Focal Adhesion Kinase*) y paxilina¹⁸⁵. Del mismo modo, CXCL12 estimula la

activación de la PI3K¹⁸⁶, NF- κ B¹⁸⁵, ZAP-70 y Vav1¹⁸⁷⁻¹⁸⁹, e induce reorganización del citoesqueleto de actina a través de la activación de las GTPasas Rho¹⁷⁹. Como se indica anteriormente, un proceso altamente regulado por CXCL12 es la actividad adhesiva de las integrinas α L β 2, α 4 β 1 y α 4 β 7^{3,14,23,144,190}, lo cual tiene importantes consecuencias en la migración transendotelial de linfocitos T.

Los ratones CXCL12 -/- y CXCR4 -/- tienen un fenotipo embriónico letal, con defectos en la vascularización del tracto gastrointestinal, la formación del tabique ventral cardíaco y el desarrollo cerebelar^{169,191}. Asimismo, también se han observado defectos en la linfopoyesis de células B y en la mielopoyesis en la médula ósea, debido a que la colonización de ésta última por progenitores hematopoyéticos se encuentra dificultada^{137,192-194}.

CXCR7 (o CCX-CKR2 o RDC1) es otro receptor de CXCL12, el cual es reciclado activamente desde la membrana al interior celular, un proceso que regula los niveles de CXCL12 extracelular, la expresión de CXCR4 y la vía de señalización CXCL12/CXCR4^{195 196}. Durante la embriogénesis en pez zebra, CXCR7 es necesario para la correcta migración de las células germinales provocando el secuestro de CXCL12 y la creación de un gradiente de esta quimioquina¹⁹⁷. También está involucrado en el desarrollo del tejido cardíaco junto con CXCR4 y CXCL12¹⁹⁸. Aunque CXCR7 fue originalmente descrito como un receptor atípico o decoy^{199,200}, se ha demostrado que es capaz de señalizar a través de la cascada de MAPK²⁰⁰, y recientemente se ha visto que en astrocitos y en células de glioma puede señalizar a través de G α i en respuesta a CXCL12, y de las β -arrestinas en respuesta a CXCL11²⁰¹.

4. Proteínas implicadas en señalización *inside-out*

4.1 Las GTPasas de la superfamilia Ras

Las GTPasas Ras son **proteínas G monoméricas** que regulan una gran cantidad de respuesta biológicas. La superfamilia Ras se divide en 5 familias: Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf y Ran²⁰². Estas proteínas presentan dos estados conformacionales: uno inactivo en el que se encuentran unidos a nucleótidos de guanosina difosfato (GDP), y uno activo en el que se unen a nucleótidos de guanosina trifosfato (GTP). El ciclo entre ambas conformaciones está regulado por proteínas **GEF** (*Guanine-nucleotide Exchange Factor*), las cuales favorecen el

intercambio de GDP por GTP; por proteínas **GAP** (*GTPase-Activating Proteins*), que catalizan la hidrólisis de GTP, estimulando la actividad GTPasa intrínseca de estas GTPasas e inactivando a la proteína; y por proteínas **GDI** (*GDP-dissociation Inhibitor*), las cuales inhiben el recambio de GDP por GTP, manteniendo inactivas a las GTPasas²⁰³ (**Figura 14**).

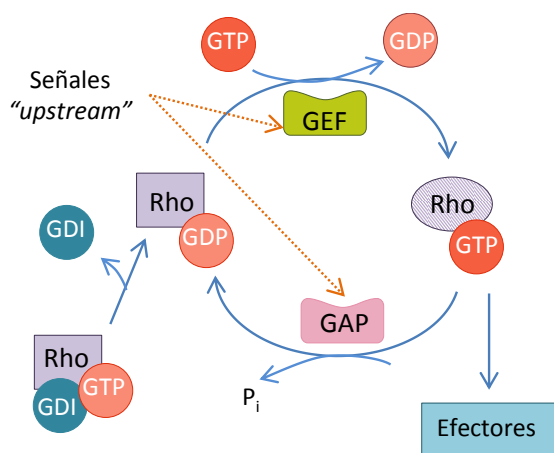


Figura 14. Regulación de la actividad GTPasa de proteínas de la familia Rho. Las proteínas GEF y GAP regulan el estado de activación de las Rho GTPasas tras la estimulación por señales *upstream*. Una vez activadas las RhoGTPasas son capaces de interactuar con efectores *downstream* para producir distintas respuestas biológicas. Adaptado de Rosman 2005²⁰³.

4.1.1 Las GTPasas Rho

Las proteínas de la familia Rho controlan la reorganización del citoesqueleto de actina y la morfología celular, y de este modo regulan la adhesión y migración celular. Asimismo, modulan la contractilidad celular, la formación de fibras de estrés, la generación de protrusiones en la periferia celular, y a la formación y estabilización de nuevas adhesiones focales^{202,204}. Asimismo, estas GTPasas están implicadas en la regulación de la transcripción, progresión del ciclo celular, proliferación celular y el tráfico vesicular de membranas. Adicionalmente, controlan el desarrollo embrionario, la reparación de heridas, la inflamación, fagocitosis y la contracción muscular, y participan en la invasión tumoral²⁰⁵.

Dicha familia está formada por 22 proteínas, siendo las más estudiadas **RhoA**, **Rac1** y **Cdc42**²⁰⁶. En base a sus funciones y secuencias, los miembros de la familia Rho se han clasificado en 5 subfamilias y 3 miembros independientes²⁰⁷. Los miembros de la subfamilia Rac estimulan la formación de lamelipodios y ondulaciones de la membrana tras la interacción con sus efectores, como WASP, WAVE y las proteínas de la familia PAK (*p-21 Activated Kinase*). Estos efectores controlan la estabilidad de los filamentos de actina a través de la regulación de la actividad del complejo Arp2/3²⁰⁸. Rac1 y Rac2 están implicadas en la diferenciación de linfocitos T y B²⁰⁹ y en la migración y adhesión leucocitaria^{187,210}.

La asociación de formas activas de Cdc42 con sus efectores promueve la formación de filopodios²¹¹, mientras que RhoA estimula la formación de adhesiones focales y fibras de estrés²¹², y regula asimismo la contractilidad celular. Entre la diversidad de estímulos que desencadenan la activación de las GTPasas Rho se incluyen las quimioquinas²¹³, factores de crecimiento y la unión integrinas-ligando²¹⁴.

4.1.2 GEF de las GTPasas Rho. La familia Vav

En las células eucariotas se han descrito tres familias GEFs para las GTPasas Rho: Dbl, Dock y SWAP70, aunque algunos GEFs de las GTPasas Ras pueden actuar asimismo sobre varias GTPasas Rho^{203,215,216}. Los miembros de la familia Dbl se caracterizan por la presencia de un dominio PH (de homología a pleckstrina) y un dominio DH (de homología a Dbl) contiguos²⁰³. El dominio DH es el dominio catalítico que media el intercambio de GDP por GTP. Para el dominio PH se han descrito diversas funciones como son potenciar la actividad del dominio DH, favorecer la unión a las GTPasas, facilitar el anclaje a la membrana celular y modular la actividad de estas proteínas por la unión de fosfolípidos de membrana, como PIP₂ y PIP₃²⁰³.

Las proteínas **Vav** conforman una subfamilia de la familia Dbl. Vav1, el primer miembro identificado de esta subfamilia, se expresa mayoritariamente en células de origen hematopoyético²¹⁷, aunque también se ha detectado su expresión en células de melanoma²¹⁸, mientras Vav2 y Vav3 tienen una expresión más ubícu²¹⁹. Vav1 actúa preferentemente sobre Rac1, Rac2 y RhoG, mientras Vav2 y Vav3 activan especialmente a RhoA y RhoG^{219,220}.

Las proteínas Vav son moléculas multidominio (**Figura 15**). En la región N-terminal se encuentran los dominios CH (homología a calponina) y Ac, un dominio rico en residuos ácidos, el cual contiene tres tirosinas reguladas precedidas por varios residuos cargados negativamente. En la parte central de la molécula se encuentra el dominio catalítico DH (con actividad GEF), el dominio PH que interacciona con polifosfoinosítidos, el dominio ZF (dedos de zinc), y el motivo PR (rico en prolina) que permite la unión con proteínas con dominios SH3. La región C-terminal presenta un módulo SH3-SH2-SH3 (dominios de homología Src) el cual proporciona a Vav el potencial para participar en diferentes interacciones con tirosinas fosforiladas y motivos ricos en prolina en proteínas efectoras.

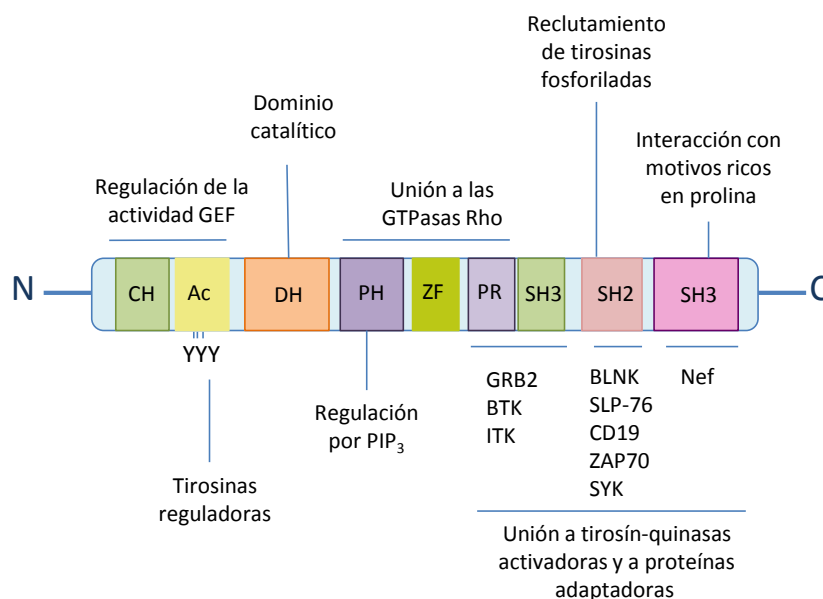


Figura 15. Organización modular de las proteínas Vav, basado en Bustelo, 2000; Zugaza et al., 2002; Turner and Billadeau, 2002²²¹⁻²²³.

Se ha descrito que el dominio CH puede estar relacionado con la movilización de calcio y la regulación de la actividad GEF de Vav. Asimismo, los dominios PH, ZF y PR podrían estar involucrados en favorecer la unión de Vav a las GTPasas. El dominio PH interviene en la modulación de la actividad GEF a través de la unión a los fosfolípidos producto de la PI3K²²³. El dominio ZF también une y/o estabiliza la interacción GEF-GTPasa durante el proceso de intercambio de nucleótidos²¹⁹, y el módulo SH3-SH2-SH3 interacciona con tirosín-quinasas y proteínas adaptadoras²²³. Finalmente, las tirosinas del dominio ácido son fosforiladas por quinasas de la familia Src y Syk, tales como ZAP-70, Fyn, Lck y Syk²²⁴.

Las interacciones entre diferentes regiones de Vav están involucradas en la regulación de la actividad GEF del dominio DH. En la conformación inactiva, los dominios DH y Ac interaccionan entre sí, bloqueando alostéricamente el sitio catalítico. La fosforilación de Vav en el residuo Y174 del dominio Ac por las quinasas Syk y Lck aumenta la actividad GEF de Vav²²⁵. Vav1 puede ser fosforilado tras diferentes estímulos, entre los que se incluye el TCR²²⁶, CXCL12^{187,189} y la adhesión dependiente de integrinas. Estudios previos en nuestro laboratorio han mostrado la importancia de la activación por CXCL12 de la vía de señalización Vav-Rac en la estimulación de la adhesión de linfocitos T dependiente de $\alpha 4\beta 1$ ¹⁸⁷.

Vav es esencial para la reorganización del citoesqueleto de actina y para la

regulación de la proliferación y apoptosis durante el desarrollo y la actividad de células linfoides²²⁰. Los linfocitos T de ratones Vav1 ^{-/-} tienen disminuida la activación de Rac²²⁷, la polimerización de actina y la adhesión celular, la secreción de citoquinas, y muestran una reducción del *clustering* de TCRs y balsas lipídicas en la sinapsis inmunológica²²⁸. Adicionalmente, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en respuesta a la estimulación de las integrinas por sus ligandos en la señalización *outside-in* también es menor.

4.2 SLP-76

SLP-76 (*SRC homology 2 (SH2)-domain-containing leukocyte protein of 76 kDa*) es una proteína con función adaptadora y sin actividad enzimática que regula la formación y localización de un complejo multimolecular formado por diferentes proteínas de señalización, entre las que se incluyen PLC- γ 1, Vav, NCK, ITK, ADAP, Lck y HPK1²²⁹. SLP-76 se expresa en linfocitos T²³⁰, plaquetas, neutrófilos, mastocitos, macrófagos, células *natural killer* (NK) y células B en desarrollo^{231,232}. Está compuesto por cuatro dominios: un “motivo α estéril” (SAM) amino-terminal, un dominio ácido con tres residuos de tirosina susceptibles de fosforilación (Y113, Y128, Y145), un dominio central rico en prolinas y un dominio carboxi-terminal SH2²³³ (**Figura 16**).

SLP-76 fue identificado como sustrato de tirosín quinasas después de la estimulación del receptor TCR, siendo un regulador positivo de la señalización *inside-out* vía este receptor²³⁴⁻²³⁶. Dicha estimulación conduce a la activación de la quinasa Lck, la cual fosforila las tirosinas de los motivos ITAMs (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) del CD3 del complejo TCR²³⁷. Esta fosforilación induce el reclutamiento de ZAP-70 (*ζ -chain associated protein kinase of 70 kDa*), la cual fosforila a SLP-76²³⁸ y al adaptador LAT (*linker for activation of T cells*). La asociación de SLP-76 y LAT provee de un **vínculo de conexión** entre el TCR y la activación de segundos mensajeros²³⁹.

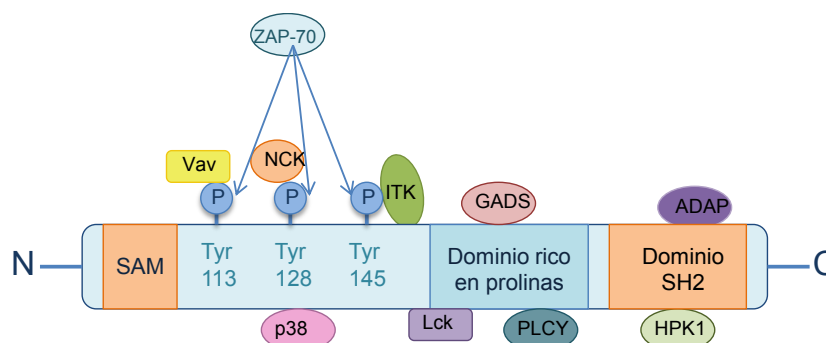


Figura 16. Estructura modular de SLP-76 humana. Posee tirosinas susceptibles de fosforilación en el extremo N-terminal, un dominio central rico en prolina y un dominio SH2 en el extremo C-terminal. Basado en Koretzky, 2006²²⁹.

En el dominio amino-terminal, la fosforilación por ZAP-70 de las tirosinas Y113 y Y128 es crucial para la interacción de SLP-76 con Vav¹²⁴⁰⁻²⁴². Asimismo, SLP-76 puede interaccionar con NCK^{238,243} y con la subunidad p85 de PI3K, mientras que la tirosina 145 se une a ITK^{168,244}. El análisis del papel de los distintos dominios de SLP-76 durante el desarrollo y función de linfocitos T ha revelado que el dominio N-terminal es requerido en ambos procesos^{245,246}. Así, la fosforilación de estas tres tirosinas es necesaria para un correcto desarrollo de los timocitos, demostrándose un bloqueo en el estadio DN3 a DN4 de su maduración en linfocitos de ratones deficientes en SLP-76^{247,248}. El dominio central rico en prolina se une a los dominios SH3 de PLC γ y GADS²⁴⁹, siendo esencial para el reclutamiento de SLP-76 a la membrana²⁵⁰. La región SH2 de SLP-76 se une a residuos de tirosina fosforilados de ADAP y a la serín-treonín quinasa HPK1^{229,251,252}. Esta región SH2 es requerida para la activación de PBL-T y para la selección positiva de los timocitos, así como para la proliferación de linfocitos T²⁵³.

Un porcentaje elevado de ratones deficientes en SLP-76 mueren perinatalmente debido a hemorragias subcutáneas en el estadio fetal. Los ratones adultos que sobreviven tienen el timo y los nódulos linfáticos muy pequeños y muestran un bloqueo temprano en la timogénesis que se traduce en la ausencia de linfocitos T periféricos^{254,255}. Además, la función de mastocitos^{239,256}, plaquetas²⁵⁷ y neutrófilos^{258,259} también se encuentra afectada. Por el contrario, presentan un número normal de macrófagos y células NK, así como un desarrollo normal de las células B.

SLP-76 no sólo es fosforilado en respuesta a la estimulación por TCR, sino que CXCL12 induce asimismo su fosforilación en tirosinas de manera dependiente

de ZAP-70^{260,261}. SLP-76 ha sido implicada en la señalización *outside-in* dependiente de integrinas, demostrándose su fosforilación en tirosinas tras la estimulación de la adhesión de linfocitos T mediada por $\alpha 4\beta 1$ ^{262,263}. Asimismo, experimentos con células deficientes en SLP-76 han demostrado que es necesaria para la activación de $\alpha L\beta 2$ en respuesta a señalización *inside-out* desde el TCR^{264,265}.

4.3 ADAP

ADAP (*Adhesion- and degranulation-promoting adaptor protein*), también conocida como SLAP-130 o Fyb, es una proteína adaptadora que es fosforilada por Fyn tras la estimulación del TCR. ADAP se une a los dominios SH2 de SLP-76 y forma una interacción tetramolecular con SLP-76, Nck y WASP en respuesta a estimulación del TCR, lo que se traduce en una reorganización del citoesqueleto de actina²⁶⁶. Se expresa en células T, células NK, mastocitos, macrófagos, precursores de osteoclastos, eritrocitos, células mieloides y sus progenitores y plaquetas²⁶⁷. Aunque ausente en las células B maduras, sí está presente en las células pro-B^{268,269}. Existen dos isoformas de ADAP, de 120 y 130 kDa, que difieren en la presencia de 46 aminoácidos adicionales en la región carboxi-terminal de la forma de 130 KDa. Ambas isoformas se localizan en citoplasma y núcleo, y se diferencian en su expresión en diferentes tipos celulares: ADAP-130 se expresa en células T maduras, donde puede potenciar la producción de IL-2, mientras la isoforma ADAP-120 lo hace preferentemente en timocitos²⁶⁸. Asimismo, ADAP-130 presenta mayor eficiencia de unión a SLP-76²⁶⁸.

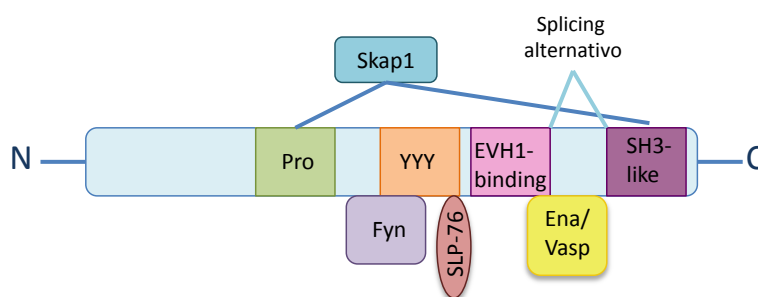


Figura 17. Estructura modular de ADAP humana. Representación de la isoforma ADAP-130, mostrando las proteínas con las que interacciona, y la región de splicing alternativo para la isoforma ADAP-120. Basado en Veale, 1999; Griffiths, 2002^{268,270}.

En cuanto a su estructura (**Figura 17**), ADAP posee una región central rica en prolina que interacciona con la proteína **SKAP-1**, tres motivos de fosforilación en tirosinas que se unen a la quinasa **Fyn** y a **SLP-76**, y un dominio de unión homólogo a Ena/VASP1 (EVH1). El extremo C-terminal presenta dos secuencias de localización nuclear próximas a dos sitios putativos SH3²⁷¹. Al igual que SLP-76, ADAP regula positivamente la señalización *inside-out* hacia las integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$ tras la estimulación del TCR, así como la formación de conjugados célula T-APC^{270,272}.

Los ratones deficientes en ADAP son viables, fértiles y muestran un crecimiento normal. Mientras el desarrollo linfocitario en estos ratones muestra mínimas alteraciones, sus células T presentan una marcada reducción en su funcionalidad²⁷². Así, muestran una inhibición en la producción de IL-2 y en su capacidad proliferativa en respuesta a estimulación por TCR. Asimismo, los linfocitos T deficientes en ADAP muestran defectos en el *clustering* y en la adhesión mediada por LFA-1²⁷⁰. En relación con estos defectos, se ha observado que la ruptura de la interacción ADAP-SLP-76 provoca alteraciones en el *clustering*, la adhesión, el *spreading* y la migración dependiente de LFA-1^{34,273}.

Se ha demostrado recientemente que ADAP puede interaccionar tanto con talina como con kindlin-3 en plaquetas, lo cual promueve activación de la integrina $\alpha \text{IIb}\beta 3$ e interacción de esta integrina con fibrinógeno²⁷⁴. A su vez, la unión de ADAP con SKAP-1 es asimismo necesaria para la adhesión celular y la proliferación^{275,276}, y resulta crítica para la activación *inside-out* de LFA-1 en respuesta al TCR²⁷⁵⁻²⁷⁸, como se explica en el siguiente apartado.

4.4 SKAP-1

SKAP-1 (o SKAP-55, *Src kinase-associated phosphoprotein of 55 kDa*) fue identificada varios años atrás como una proteína adaptadora que se une a ADAP y que constituye un sustrato de la quinasa Fyn²⁷⁸. SKAP-1 se expresa principalmente en células T y tiene un papel esencial en la regulación de la formación del complejo Rap1-RapL-LFA-1²⁷⁹.

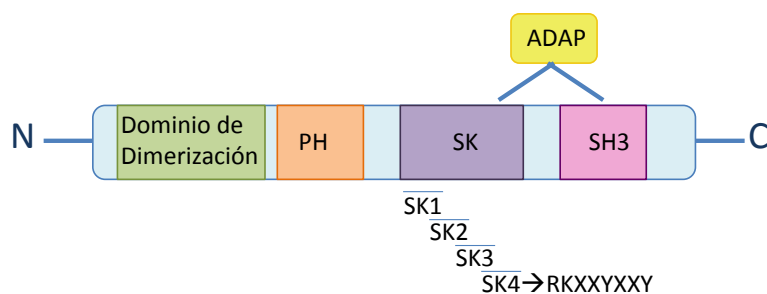


Figura 18. Estructura modular de SKAP-1 humana. Consta de una región de dimerización en la región N-terminal, un dominio PH de homología a plekstrina, un dominio SK con repeticiones de glutámico, y un dominio SH3. Basado en Duke-Cohan, 2006²⁸⁰.

SKAP-1 consta de tres dominios bien diferenciados, tal y como se muestra en la **Figura 18**^{278,281,282}. SKAP-1 se une con alta estequiometría a ADAP, una interacción que es mediada por la unión del dominio SH3 de SKAP-1 a la región rica en prolinas de ADAP^{267,283}, y por la débil unión del motivo SH3 de ADAP a un motivo basado en tirosinas RKXXYXXY de SKAP-1^{280,283}. Notablemente, la ausencia de ADAP desestabiliza la expresión de SKAP-1^{275,277,278}, mientras que las células T deficientes en SKAP-1 mantienen la expresión de ADAP en niveles normales²⁷⁵.

SKAP-1 es un regulador positivo del *clustering* de la integrina $\alpha\text{L}\beta 2$ en respuesta al TCR, y colocaliza con la actina en la interfase del complejo célula T-APC^{275,276,284}. La dimerización de SKAP-1 y su interacción con ADAP promueve la estabilización de los *microclusters* de SLP-76 y la adhesión de linfocitos T estimulada por el TCR mediante mecanismos independientes de las integrinas $\beta 1$ ²⁸⁵. Se ha mostrado que la función de SKAP-1 no puede ser reemplazada por su homólogo SKAP-2 (SKAP-HOM), el cual es expresado ubícuamente²⁸⁶.

La asociación de ADAP y SKAP1 es requerida asimismo para el reclutamiento de Rap1 y RIAM a la membrana celular^{276,278,279}. Se han descrito dos *pools* de proteínas que interaccionan con ADAP-SKAP-1 en linfocitos T: uno contiene **RapL**-Mst-1 y el otro **RIAM**-Mst-1-Kindlin-3. El dominio N-terminal de SKAP-1 se une al dominio SARAH en la región C-terminal de RapL, lo que lleva a la formación del complejo RapL-Rap1-SKAP-1. A su vez, el reclutamiento de RIAM a la membrana es necesario para la regulación de la adhesión de linfocitos T tras la activación del TCR. Recientemente se ha descrito que el módulo ADAP-SKAP-1-RIAM-Rap1 es reclutado a la membrana plasmática independientemente de SLP-76 en respuesta a la estimulación con CXCL12²⁶⁴, contribuyendo al reclutamiento de

talina hasta las integrinas²⁸⁵. Ambos *pools* de proteínas requieren ADAP y SKAP-1 para asociarse a LFA-1^{282,287}.

Linfocitos T de ratones SKAP-1 ^{-/-} tienen defectos en la adhesión mediada por integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$ y en el *clustering* de LFA-1, así como alteraciones en la expresión de IL-2 y en la proliferación²⁷⁵. Dichos linfocitos T muestran una disfunción general similar a los linfocitos que carecen de ADAP, indicando que SKAP-1 sería un efector dentro del complejo ADAP-SKAP-1. La ausencia de SKAP-1 en linfocitos T no afecta a la motilidad inducida por las quimioquinas CXCL12 y CCL21^{288,289}.

Objetivos

- El primer objetivo consistió en el **análisis del papel de SLP-76, ADAP y SKAP-1 en la estimulación por quimioquinas de la adhesión de linfocitos T dependiente de $\alpha 4\beta 1$.**
- En el segundo objetivo se estudió la **implicación de ICAP-1 en la adhesión mediada por la integrina $\alpha 4\beta 1$.**
- En el tercer objetivo se analizó **la dinámica de difusión lateral de la integrina $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a CXCL12.**

Materiales y Métodos

1. Cultivos celulares y purificación de linfocitos T

Las líneas celulares humanas T Molt-4 y Jurkat se cultivaron en medio RPMI 1640 (Lonza, Verviers, Belgium) suplementado con 7% de suero fetal bovino (FBS) (Gibco Invitrogen, Paisley, Reino Unido), 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomicina (Gibco Invitrogen) (medio completo). La línea celular J14 fue cedida por los Drs. Balbino Alarcón y Aldo J. Borroto (Centro de Biología Molecular, CSIC, Madrid), procedente originalmente del Dr. Gary A. Koretzky (University of Pennsylvania, Philadelphia, EEUU), y fue cultivada en medio completo.

Los linfocitos T de sangre periférica (PBL-T) se aislaron de la fracción mononuclear de *buffy coats* procedentes de donantes sanos, utilizando un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque (1,077 g/ml, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Las células T fueron aisladas mediante selección negativa usando *beads* magnéticas conjugadas con anticuerpos anti-CD14, anti-CD16, anti-CD19, anti-CD36, anti-CD56, anti-CD123 y anti-Glicoforina A (Pan T Cell Isolation Kit II, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) y seleccionadas posteriormente bien mediante el sistema de separación magnética AUTOMACs™ o mediante el uso de columnas LS (Miltenyi Biotec).

Para el aislamiento de linfocitos T de ratón, se obtuvieron suspensiones celulares homogéneas mediante la disrupción mecánica del bazo y de ganglios linfáticos periféricos y mesentéricos. Posteriormente se llevó a cabo la selección de células T mediante columnas de selección positiva (Mouse CD3+ T Cell Enrichment Column, R&D Systems). A continuación, las células se resuspendieron a $1 \cdot 10^6$ /ml en medio RPMI 1640 con 10% FBS, 100 U/ml de penicilina, 100 U/ml de estreptomicina y 50 nM de β -mercaptoetanol, en presencia de los anticuerpos anti-CD3 clon 2C11 (Biolegend, San Diego, CA) (2 μ g/ml) y anti-CD28 clon 37.51 (Biolegend) (5 μ g/ml). Después de 2-3 días, se añadió IL-2 (20 ng/ml) al medio para estimular la expansión celular. El medio fue sustituido cada dos días, añadiéndose IL-2 adicional. El día anterior a la realización de los experimentos, las células fueron lavadas con medio completo y mantenidas en medio RPMI 1640 con 2,5% FBS, glutamina, antibióticos y β -mercaptoetanol.

Las células endoteliales procedentes de cordón umbilical humano (HUVECs) (ATCC, UK) fueron cultivadas sobre una base de gelatina al 0,2% (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), en medio EBM (Lonza, Verviers, Belgium) suplementado con factores de crecimiento (VEGF, EGF), hidrocortisona, extracto de cerebro bovino (BBE) ácido ascórbico, anticuerpos y FBS al 10%.

2. Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados para el desarrollo del presente trabajo se presentan en la siguiente **Tabla 2**:

Anticuerpo	Especificidad	Procedencia
P3X63	Ag8 de la proteína murina de mieloma P3X63	Dr. Francisco Sánchez-Madrid (Hospital de la Princesa, Madrid)
RP2/21	CD45	Dr. F. Sánchez-Madrid
HP 1/2	Integrina $\alpha 4$ (inhibidor de la adhesión)	Dr. F. Sánchez-Madrid
TS2/16	Integrina $\beta 1$	Dr. F. Sánchez-Madrid
$\beta 1A$	Integrina $\beta 1$	Dr. Guido Tarone (Universidad de Turín, Italia)
mAb 18	Integrina $\beta 1$	BD Biosciences Pharmigen Pharmigen (San Diego, CA)
Huts-21	Integrina $\beta 1$ activa	Dr. Carlos Cabañas (CBM/UAM, CSIC)
Huts-21	Integrina $\beta 1$ activa	BD Biosciences
Anti-GFP	Green Fluorescent Protein	Molecular Probes/Invitrogen (Carlsbad, CA)
Anti- β -Actina	β -Actina	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)
Anti-Vinculina	Vinculina	Sigma-Aldrich
Anti-Rac	GTPasa Rac	BD Biosciences Pharmigen
Anti-RhoA	GTPasa RhoA	Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA)

Anti-Vav1 C14	Vav1	Santa Cruz Biotechnologies
Anti-Fosfo-Vav1	Fosfo-Vav1	Abcam (Cambridge, Reino Unido)
Anti-talina 8D4	Talina	Sigma-Aldrich
Anti-kindlin-3	Kindlin-3	Sigma-Aldrich
Anti-ZAP-70	ZAP-70	Dr. Jose María Rojo (CIB, Madrid)
Anti-SLP-76	SLP-76	Santa Cruz Biotechnologies
Anti-ADAP	ADAP	Santa Cruz Biotechnologies
Anti-ICAP-1 ratón	ICAP-1 α ratón	Dr. Bouvard (Institut Albert Bonniot, Grenoble, Francia)
Anti-ICAP-1 humano	ICAP-1 α humano	Dra. Corine Albiges-Rizo (Institut Albert Bonniot, Grenoble, Francia)
Anti-SKAP-1	SKAP-1 (SKAP-55)	BD Biosciences Pharmingen
Anti-VCAM-1	VCAM-1	Santa Cruz Biotechnologies
Anti-CD3 clon 2C11	CD3 ratón	Biolegend
Anti-CD28 clon 37.51	CD28 ratón	Biolegend

Tabla 2. Anticuerpos utilizados.

3. Vectores de expresión y siRNAs

-Vectores de expresión: El vector pEGFP-C1, codificante para GFP, fue adquirido a BD Biosciences Clontech (Palo Alto, CA). El vector que codifica para la forma constitutivamente activa de Rac (GFP-RacV12) fue donado por el Dr. Francisco Sánchez-Madrid. El vector de expresión PRNK procede del Dr. Ivan Dikic (Goethe University School of Medicine, Frankfurt, Alemania) y fue cedido por el Dr. José Luis Rodríguez-Fernández (CIB, Madrid). El vector pEGFP-SKAP-1 fue donado por el Dr. Christopher E. Rudd (University of Cambridge).

- siRNAs:

En la **Tabla 3** se muestran las secuencias de las hebras sentido y complementaria de cada uno de los oligos de siRNA empleados en este trabajo.

siRNA	Hebra sentido Hebra complementaria	Casa comercial
CNTRL47	AUUGUAUGCGAUCGCAGACdTdT GUCUGCGAUCGCAUACAAUdTdT	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)
ADAP (#1)	GCAAAGGCCAGACGUCUUAUdTT UAAGACGUCUGGCCUUUGCUUdTdT	Sigma-Aldrich
ADAP (#2)	GAGAUUUAAGUUUGCCCUdTdT AGGGCAAACUUGAAAUCUCdTdT	Sigma-Aldrich
SLP-76	SmartPool	Dharmacon (Lafayette, CO)
ICAP-1	GUGAGUUAACUCUCAUGAdTT UCAUUGAGAGUUAACUCACdTdT	Sigma-Aldrich
PYK2	GAUGUGGUCCUGAAUCGUAdTT UACGAUUCAGGACCACAUCdTdT	Sigma-Aldrich
SKAP-1 (#1)	CAAAGAUAUAGUUUCUUdTdT AAAGAAACUAUGAUCUUUGdTdT	Sigma-Aldrich
SKAP-1 (#2)	GAGUGACUGUAAGCUACCAdTdT UGGUAGCUUACAGUCACUCdTdT	Sigma-Aldrich
SKAP-1 (#3)	SmartPool	Dharmacon

Tabla 3. Relación de siRNAs empleados en la presente Tesis.

4. Transfección celular

La línea celular Molt-4 fue transfectada de forma transitoria mediante nucleofección con los diferentes vectores de expresión u oligos de siRNA. En el caso de los vectores de expresión se utilizaron 1-2 μ g de cada vector/ 10^6 células, mientras que los siRNAs fueron utilizados a una concentración final de 200 nM. Para ello, las células Molt-4 se cultivaron 48 h antes de la transfección hasta una confluencia de $2,5 \cdot 10^5$ células/ml, tras lo cual se nucleofectaron con el dispositivo Amaxa Nucleofector™ (Amaxa, Colonia, Alemania), utilizándose el protocolo C-05, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la nucleofección de linfocitos T humanos de sangre periférica, las células fueron lavadas previamente con PBS/EDTA 0,3 mM, y posteriormente transfectadas utilizando el protocolo U-14

(Amaxa). Las células Molt-4 y PBL-T se cultivaron tras su transfección (24-30 h las líneas celulares, o 16 h las células primarias) en medio completo en presencia de 5% o 10% de FBS, respectivamente, y posteriormente se analizó la eficiencia de transfección por citometría de flujo o por *western blot* para evaluar los niveles de silenciamiento de las proteínas de interés. Estos transfectantes se usaron en ensayos de adhesión celular estática y en condiciones de flujo, *binding* soluble de VCAM-1 o anticuerpos, ensayos de spreading celular, citometría de flujo, inmunoprecipitación, ensayos GTPasa y RT-PCR. La viabilidad de los distintos transfectantes fue comprobada mediante análisis de ciclo celular con yoduro de propidio y anexina-FITC.

5. *Western blotting*

Las células Molt-4 o PBL-T se sometieron a *starving* privándolas de suero durante 3 h antes de su lisis, mediante incubación en medio de adhesión [RPMI 1640/0,5% BSA (Roche Applied Science, Indianapolis)]. A continuación, las células se solubilizaron a 4°C en solución de lisis GST-FISH (ver **Tabla 8**, página 63), centrifugándose los lisados (15 min a 4°C, velocidad máxima). Los sobrenadantes se cuantificaron mediante Bradford (Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), midiéndose las muestras en un espectrofotómetro a 595 nm para determinar la cantidad de proteína total. Tras hervir las muestras (50-100 µg de proteína total) en solución de carga, las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (8-12 %) en presencia de SDS (SDS-PAGE), y posteriormente electrotransferidas a membranas de PVDF (Bio-Rad Laboratories). Las membranas fueron bloqueadas en solución de bloqueo (**Tabla 8**), incubándose a continuación durante 2 h con los anticuerpos primarios correspondientes en dicha solución. Las membranas fueron posteriormente lavadas con 0,1% Tween-20 en TBS, y finalmente incubadas 1 h con anticuerpos secundarios conjugados con HRP (Jackson Immuno Research, West Grove, PA). Las proteínas se visualizaron usando el sustrato quimioluminiscente Immobilon Western (Millipore, Billerica, MA), y las bandas proteicas fueron densitometradas para su cuantificación con el programa ImageJ. Para posteriores análisis, las membranas fueron sometidas a un proceso de *stripping* para liberar los anticuerpos unidos. A continuación, las membranas fueron lavadas y bloqueadas

de nuevo para ser incubadas con distintos anticuerpos, siguiendo el método indicado más arriba.

5.1 Inmunoprecipitación

Para llevar a cabo las inmunoprecipitaciones se siguió un protocolo ya descrito²⁹⁰. Las células ($1,5 \cdot 10^7$ para células Molt-4 y $3 \cdot 10^7$ en el caso de PBL-T) se sometieron a *starving* durante 3 h antes de ser preincubadas en presencia o ausencia de CXCL12 (200 ng/ml). Las células se lisaron con solución de lisis (**Tabla 8**), y tras centrifugar, los lisados fueron pre-incubados durante 1 h a 4°C con proteína G Sefarosa (GE Healthcare BioSciences AB, Uppsala, Suecia) para reducir interacciones inespecíficas. A continuación, los sobrenadantes se incubaron durante 2-4 horas a 4°C con los anticuerpos primarios correspondientes, seguido del acoplamiento específico de dichos anticuerpos a *beads* de proteína G sefarosa durante 2 h. Finalmente, las proteínas unidas fueron eluidas en solución de carga, resueltas por SDS-PAGE y analizadas por *western blot*.

5.2 Ensayos de actividad GTPasa

Las proteínas de fusión GST-PAK-CD y GST-C21 (cedidas por el Dr. John G. Collard, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Holanda), las cuales reconocen formas activas de Rac1 y RhoA, respectivamente, fueron preparadas como se ha descrito previamente (Sander, 1998). En el caso de GST-PAK-CD, ésta puede ser usada tanto para unir formas activas de Rac1 como de Cdc42. Las células Molt-4 ($3 \cdot 10^7$ por condición) se sometieron a *starving* durante 2 h en medio de adhesión, y a continuación, las suspensiones celulares se incubaron a 37°C durante distintos tiempos con CXCL12 (200 ng/ml), seguido de un rápido lavado con PBS frío para detener la reacción. Posteriormente las células fueron lisadas en 300 µl de solución de lisis GST-FISH y, tras la clarificación de los sobrenadantes, una alícuota (15 µl) de cada muestra fue recogida como control del lisado total. El resto del sobrenadante fue incubado durante 16 h a 4°C con las proteínas de fusión en presencia de glutation-sefarosa (GE Healthcare). Tras centrifugar y lavar las *beads*, éstas se hirvieron en solución de carga para eluir las proteínas unidas. Las proteínas se resolvieron en geles de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS y

se transfirieron a membranas de PVDF, las cuales fueron analizadas por *western blotting* con anticuerpos anti-Rac1 o anti-RhoA.

5.3 Ensayos de Fraccionamiento celular

Las células Molt-4 se sometieron a *starving* ($3 \cdot 10^6$ células por condición), tras lo cual fueron expuestas a CXCL12 durante diferentes tiempos. A continuación se resuspendieron en 500 μ l de buffer hipotónico de extracción (**Tabla 8**), incubándose en hielo durante 10-15 min. Los lisados fueron centrifugados (30 min a 4°C, velocidad máxima) recogiendo posteriormente el sobrenadante (fracción citosólica). El pellet (fracción membranal) se incubó en hielo durante 20 min con 50-100 μ l de solución de lisis B (**Tabla 8**), tras lo cual se centrifugó 30 min a velocidad máxima, recogiendo el sobrenadante (fracción de membrana). Las proteínas de cada fracción se analizaron mediante *western blotting* utilizando RhoGDI y CD45 como controles de la fracción citosólica y de membrana, respectivamente.

6. Citometría de flujo

Las células fueron incubadas durante 30 min en hielo con los anticuerpos primarios (10 μ g/ml) en PBS y en presencia de gammaglobulinas humanas (10 μ g/ml). Tras un paso de lavado mediante centrifugación en PBS frío, las células se incubaron durante 30 min a 4°C en oscuridad con los anticuerpos secundarios conjugados con fluoresceína (FITC, Jackson Immunoresearch Lab., West Grove, PA) o Alexa 488 (Dako Denmark A/S, Glostrup, Dinamarca), analizándose en un citómetro de flujo Coulter Epics XL (Beckman-Coulter, Brea, CA).

6.1 Ensayos de unión soluble de VCAM-1

Las células Molt-4 nucleofectadas con distintos siRNA fueron sometidas a *starving* y posteriormente resuspendidas en 25 μ l de solución de unión (**Tabla 8**) a una concentración de $2 \cdot 10^6$ /ml, pre-incubándose a continuación durante 20 min a 37°C en presencia o ausencia de anticuerpos (10 μ g/ml). Seguidamente, las células fueron incubadas durante 30 segundos a 37°C en solución de unión, en ausencia o presencia de CXCL12 (200 ng/ml), tras lo cual se añadió el VCAM-1-Fc a concentraciones saturantes (20 μ g/ml), incubándose la mezcla desde 75 segundos

hasta 4 min a 37°C. En las condiciones que implicaban exposición a Mn^{2+} , tras la pre-incubación con anticuerpos, las células se incubaron directamente con VCAM-1-Fc en solución de unión suplementado con 1 mM de $MnCl_2$. La unión de VCAM-1-Fc fue detenida mediante lavado con solución de unión fría, la cual contenía 0,5 mM de $MnCl_2$ en el caso de las células estimuladas con Mn^{2+} . Finalmente, se usó un anticuerpo secundario anti-IgG Fc humano (Jackson ImmunoResearch Lab.) y las muestras se analizaron en el citómetro de flujo.

6.2 Detección de las formas activadas de integrinas $\beta 1$

Para analizar el estado de activación de las integrinas $\beta 1$, las células Molt-4 sin transfectantes o nucleofectadas con distintos siRNA fueron sometidas a *starving* y resuspendidas a continuación en 25 μ l de solución de unión a una concentración de $2 \cdot 10^6$ /ml. Posteriormente, las células fueron incubadas durante 30 s a 37°C en solución de unión en presencia o ausencia de CXCL12 (200 ng/ml), tras lo cual se añadió el anticuerpo anti- $\beta 1$ HUTS-21, el cual reconoce epítomos de activación en integrinas $\beta 1$. Este anticuerpo fue utilizado a una concentración final de 10 μ g/ml y se incubó con las células durante 30 min a 4°C. En los experimentos que implicaban exposición a Mn^{2+} , las células se incubaron directamente con HUTS-21 en solución de unión suplementada con 1 mM de $MnCl_2$. La unión del anticuerpo fue detenida mediante lavado con solución de unión fría, la cual contenía 0,5 mM de $MnCl_2$ en el caso de las células estimuladas con Mn^{2+} . Finalmente, las muestras se analizaron mediante citometría de flujo.

6.3 Ensayos de polimerización de actina

Tras un *starving* previo, las células Molt-4 ($1 \cdot 10^6$ /ml por condición) fueron expuestas a CXCL12 (200 ng/ml) durante diferentes tiempos. A continuación, las células fueron fijadas y permeabilizadas durante 15 min a temperatura ambiente con 1% formaldehído (PFA) y 0,1% Tritón-X100 (Sigma-Aldrich). Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS, incubadas con la solución de tinción Faloidina-FITC y finalmente analizadas mediante citometría.

6.4 Ensayos de quimiotaxis

Las células fueron sometidas a un *starving* previo, y posteriormente fueron resuspendidas ($3 \cdot 10^5$ por condición) en medio de adhesión y añadidas a la parte superior de filtros de cámaras Transwell (Costar) de 5 μm de tamaño de poro. Los compartimentos inferiores se llenaron con 600 μl de medio de adhesión con o sin CXCL12 (200 ng/ml), procediéndose a una incubación de 4 h a 37°C. El grado de quimiotaxis fue analizado en un citómetro de flujo, para lo cual se pasó cada muestra en las mismas condiciones de tiempo y velocidad de flujo.

6.5 Ensayos de migración transendotelial

Las células HUVEC ($5 \cdot 10^4$ por condición) fueron plaqueadas en la parte superior del filtro de cámaras Transwell (Costar, 5 μm de tamaño de poro) previamente tapizadas con fibronectina (20 $\mu\text{g/ml}$; Gibco BRL). Tras alcanzar la confluencia, las monocapas de HUVEC se incubaron durante 16 h con TNF- α (15 ng/ml; R&D System) para inducir la expresión en superficie de VCAM-1. Los compartimentos inferiores se llenaron con 600 μl de medio de adhesión en presencia o ausencia de CXCL12 (200 ng/ml). Las células Molt-4 transfectadas ($3 \cdot 10^5$ por condición) fueron resuspendidas en medio de adhesión en presencia o ausencia de anticuerpos (10 $\mu\text{g/ml}$) y añadidas a la parte superior de cámaras Transwell, seguido de una incubación de 3,5 horas a 37°C. El nivel de migración celular fue analizado por citometría de flujo, para lo cual se pasó cada muestra en las mismas condiciones de tiempo y velocidad de flujo.

6.6 Ensayos de Viabilidad celular con Anexina-Ioduro de Propidio

La viabilidad celular fue analizada utilizando el kit de Anexina V-FITC (Immunostep, Salamanca). Las células fueron lavadas con PBS y resuspendidas ($3 \cdot 10^5$ por condición) en medio de unión a Anexina V (**Tabla 8**). A continuación fueron marcadas con Anexina V-FITC durante 10 min a temperatura ambiente en oscuridad. Después de este periodo, se añadieron 400 μl del citado medio de unión, y posteriormente ioduro de propidio (10 $\mu\text{g/ml}$), analizándose las muestras por citometría de flujo.

7. Ensayos de proliferación celular con el reactivo CCK-8

Las células en suspensión fueron añadidas en placas de 96 pocillos (100 µl/pocillo). En paralelo, se prepararon pocillos con un número de células viables conocido, para crear una curva de calibración. La sal de tetrazolio (Water Soluble Tetrazolium Salt) WST-8 (5 µl, Sigma-Aldrich) fue añadida en cada pocillo, evitando la formación burbujas en los pocillos que podrían interferir en la lectura posterior de la densidad óptica. Las placas se incubaron durante 1-4 h a 37°C. La sal de tetrazolio es reducida por la actividad deshidrogenasa de las células para dar una sal de color amarillo, la cual es soluble en el medio de cultivo. Finalmente, la absorbancia se midió a 450 nm usando un lector de fluorescencia para placas, y el valor de la absorbancia se comparó con la curva de calibración.

8. Ensayos de adhesión celular estática

Como ligandos recombinantes de $\alpha 4\beta 1$ se utilizó FN-H89, el cual contiene la región CS-1²⁹¹ de la fibronectina, y VCAM-1-Fc, formada por los dominios 1-4 de VCAM-1²⁹².

FN-H89 se obtuvo a partir de bacterias DH5- α transformadas con el vector pGEX-2T-FN-H89. Tras la lisis de los transformantes y centrifugación, el sobrenadante se pasó por una columna de glutation-agarosa, donde quedó retenida la proteína de fusión, la cual se eluyó usando la solución de elución A. La proteína purificada fue digerida con trombina (15 unidades/g proteína; Sigma Aldrich) y la digestión se pasó por una columna de heparina-sepharosa (GE Healthcare) en la que quedó retenida la FN-H89. Ésta se eluyó con solución de elución B (**Tabla 8**), dializándose la proteína finalmente en PBS. Para la obtención de VCAM-1-Fc, las células COS-7 fueron transfectadas con el plásmido pVCAM-1-4D+Fc recogiendo el sobrenadante de las células tras 6 días de cultivo en medio DMEM (Gibco Invitrogen) suplementado con 10% FBS. VCAM-Fc se purificó finalmente de los sobrenadantes usando columnas de proteína Sefarosa-A.

Una vez obtenidos los ligandos mencionados, éstos fueron incubados en placas de 96 pocillos (High Binding, Costar, Cambridge, MA) en solución de tapizado (**Tabla 8**), inmovilizándose en ausencia o presencia de CXCL12 (650 ng/ml) (R&D Systems) o CCL21 (650 ng/ml) (Peptrotech, London, UK). FN-H89 y VCAM-1 fueron tapizados a una concentración final de 5 µg/ml. Previamente a la

adhesión, las células fueron marcadas con 2', 7'-bis (carboxietil)-5 (6')-carboxifluoresceinacetoximetilester (BCECF-AM) (Molecular Probes, Leiden, Holanda) durante 30 min a 37°C. Posteriormente, las células se resuspendieron en medio de adhesión y fueron añadidas a los pocillos por triplicado ($7,5 \times 10^4$ /pocillo para células Molt-4, Jurkat y J14, y $1,25 \times 10^5$ /pocillo para las PBL-T), en un volumen final de 100 μ l. Tras una breve centrifugación de 5 s para favorecer el decantamiento de las células al fondo del pocillo, las placas se incubaron de 2-4 min a 37°C, seguido de varios lavados con medio RPMI 1640 sin suero para eliminar las células no adheridas. Posteriormente las células adheridas fueron lisadas con 0,1% SDS en PBS, y el nivel de adhesión se determinó mediante un analizador de fluorescencia para placas (Polar Star Galaxy, BMG Labtechnologies, Offenburg, Alemania).

9. Ensayos de adhesión celular en cámaras de flujo

Este ensayo se realizó esencialmente siguiendo el método descrito²⁹³. Para ello se tapizaron placas Petri con 15 μ l de una solución de VCAM-1-Fc en PBS (1 μ g/ml; R&D Systems) en presencia o ausencia de CXCL12 (650 ng/ml), y posteriormente las placas fueron incorporadas como pared inferior de una cámara de flujo (**Figura 19**). Las diferentes suspensiones celulares fueron perfundidas a 2 dinas/cm² antes de ajustar el flujo a 1 dina/cm² (0,102 ml/min). El campo estudiado fue observado con un objetivo 10x de un microscopio invertido, usando contraste de fase, y los distintos tipos de interacciones celulares se grabaron durante 4 min para su posterior análisis. En los diferentes tipos de transfectantes se procedió a filmar el mismo campo visual para así excluir posibles diferencias originadas por una diferente densidad del ligando tapizado.

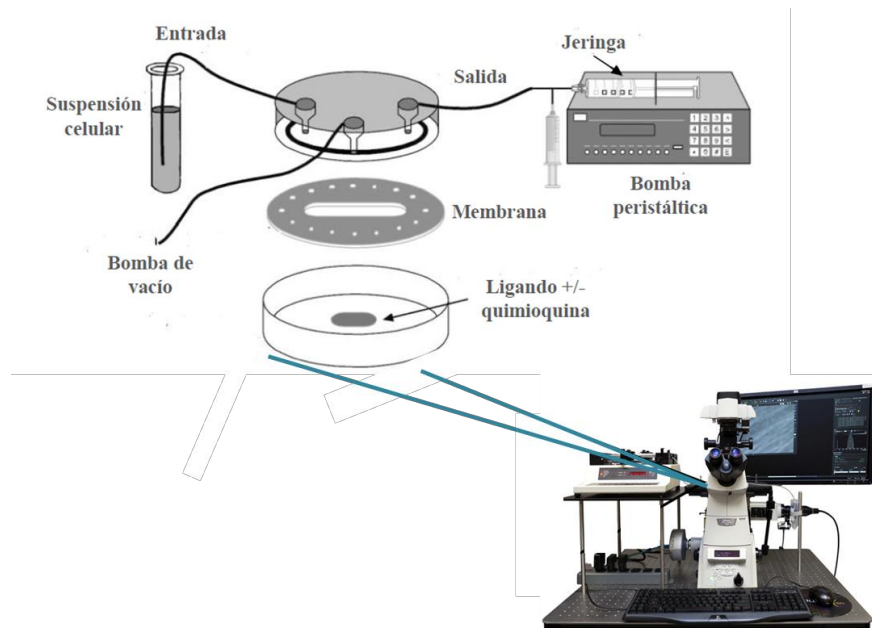


Figura 19. Esquema del montaje del circuito de adhesión en cámara de flujo y dispositivo de videomicroscopía utilizado para la grabación a tiempo real de la adhesión de células T en condiciones que simulan el flujo sanguíneo fisiológico.

Se definió adhesión estable a la adhesión de aquellas células que inicialmente hicieron *rolling* y que posteriormente se adhirieron firmemente al ligando al menos durante 20 s. Por otro lado, al grupo de células que se adhirieron de forma transitoria y que a continuación hicieron *rolling* de nuevo se les denominó con el término de adhesión transitoria (células que se adhirieron un máximo de 5 s). Por otro lado, la fracción de células que interaccionaron con el ligando pero que no se adhirieron firmemente en ningún momento se les denominó con el término de *rolling*.

Para evaluar la resistencia celular al flujo, éste se detuvo durante 4 min para permitir el decantamiento y la posterior adhesión. Tras ello se volvió a aplicar un flujo de 1 dina/cm², que se fue aumentando de forma creciente en 1 dina/cm² cada 30 s, hasta alcanzar 10 dinas/cm². El número de células que permanecieron adheridas en cada incremento de flujo se determinó como el porcentaje referido al número total de células adheridas tras el periodo inicial de adhesión de 4 min.

10. Ensayos de *spreading* celular

Para analizar el *spreading* celular, las células fueron adheridas durante distintos tiempos a VCAM- 1 en presencia o ausencia de CXCL12. A continuación, las células fueron fijadas con PFA al 2% en PBS durante 15 min, lavadas y

montadas con mowiol. Las células fueron analizadas por microscopía confocal en un microscopio Leica-TCS-SP5-AOBS (Wetzlar, Alemania) mediante visualización por Nomarski e IRM, representándose el porcentaje de *spreading* celular tras el análisis de diversos campos representativos.

11. Ensayos de motilidad celular utilizando microscopía en tiempo real

Los estudios de motilidad celular se realizaron sobre superficies (Chambered Coverglass LAB-TEK, NUNC) tapizadas a 4°C durante toda la noche con VCAM-1 (4 µg/ml, diluido en PBS) en ausencia o presencia de CXCL12 (650 ng/ml). Los linfocitos fueron previamente mantenidos 14-16 h con 5% FBS sin IL-2, y posteriormente lavados y resuspendidos en medio HBSS con 1,2 mM CaCl₂ y 6 mM MgCl₂ a una confluencia final de 1·10⁶/ml. Se usó el objetivo 20X (1 imagen cada 10 s/120 ciclos durante 20 min), y para el análisis (90 trayectorias/condición) se utilizó el programa FIJI.

12. Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

Las células Molt-4 transfectadas con diferentes siRNA fueron lisadas con el compuesto TriReagent (Sigma-Aldrich), aislándose posteriormente los RNAs mensajeros y obteniéndose a partir de ellos los DNAs complementarios (cDNAs), utilizando la transcriptasa inversa M-MLV (Promega, Madison, WI). La cuantificación del RNA se realizó midiendo la absorbancia del extracto a 260 nm (A₂₆₀) y 280 nm (A₂₈₀) de longitud de onda con el Nanodrop ND-1000. Una absorbancia de 1 unidad, medida a 260 nm, corresponde a una concentración de 40 µg/ml en el caso de RNA. El cociente entre las absorbancias A₂₆₀/A₂₈₀ se utilizó como indicador de la pureza de los ácidos nucleicos contenidos en la muestra.

La amplificación de los cDNAs se realizó por qPCR (Termociclador iQ5 BIO-RAD de PCR a tiempo real) usando los oligonucleótidos mostrados en la **Tabla 4** y la polimerasa Taq (Invitrogen Corp), utilizándose TBP (*TATA-Binding Protein*) como referencia. El protocolo de PCR para la amplificación se muestra en la **Tabla 5**. La qPCR está basada en la detección y cuantificación de un reportero fluorescente. La señal aumenta en proporción directa a la cantidad de producto de PCR en la reacción. Gracias a la lectura del aumento en la emisión de la

fluorescencia en cada ciclo, es posible monitorizar la reacción de producto de PCR correlacionado con la referencia.

Proteína	Oligonucleótido	
TBP	Forward	5'-CGGCTGTTTAACTTCGCTTC-3'
	Reverse	5'-CACACGCCAAGAAACAGTGA-3'
ICAP-1	Forward	5'-ACCGTCATCGTAACACACCA-3'
	Reverse	5'-AAAACCTTGCAAATGGCTTG-3'

Tabla 4. Relación de oligonucleótidos utilizados en ensayos de PCR cuantitativa realizados en células humanas.

Paso	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Pre-amplificación	1	95°C	5 min
Amplificación	50	95°C	10 s
		60°C	30 s
Melting	1	95°C	1 min
		60°C	1 min
		97°C	Continuo
Cooling		4°C	

Tabla 5. Protocolo de qPCR para células humanas.

1.3. Genotipado de los ratones ICAP-1

Debido a la baja fertilidad de los ratones ICAP-1 $-/-$, éstos se obtuvieron mediante el cruce de ratones heterocigotos ICAP-1 $+/-$. Los animales se genotiparon a partir de DNA genómico extraído del tejido endotelial de la cola del animal. Los oligonucleótidos utilizados para este genotipado se describen en la **Tabla 6**, y el protocolo de PCR usado se indica en la **Tabla 7**.

Gen	Secuencia
ICAP-1 forward	5'-CTGCCTCTGTCTTTCGAGTGC-3'
ICAP-1 reverse	5'-ACCCTGGCCTCTTACCTTGC-3'
LacZ reverse	5'-CATTCAGGCTGCGCAACTGTT-3'

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados en el genotipado de los ratones ICAP-1 $+/+$, ICAP-1 $+/-$ y ICAP-1 $-/-$.

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Pre-amplificación	95°C	3 min	1
Amplificación	94°C	30 s	10
	62°C	30 s	
	72°C	30 s	
	95°C	30 s	35
	52°C	30 s	
	72°C	30 s	
Melting	72°C	5 min	1
Cooling	20°C	1 h	1

Tabla 7. Protocolo de PCR utilizado en el genotipado de los ratones ICAP-1 +/+, ICAP-1 +/- y ICAP-1 -/-.

Los productos de PCR se resolvieron en geles de agarosa 2%/TBE 1x (89 mM Tris-borato, 2 mM EDTA, pH 8,0). Los ratones ICAP-1 +/+ mostraban un fragmento de DNA de 217 pb (pares de bases), mientras los ratones ICAP-1 -/- mostraban un fragmento de 309 pb. Los heterocigotos mostraban ambas bandas.

14. Microscopía confocal y microscopía de super-resolución STED (*Stimulated emission depletion*)

Los cristales (Chambered cover glasses; 8 wells, Nunc Lab-Tek II) fueron incubados con Poli-L-Lisina (10 µg/ml, Sigma-Aldrich) durante 30 min. Las células (1·10⁶/ml) resuspendidas en medio RPMI 1640 fueron posteriormente adheridas a la poli-L-lisina durante 30 min e incubadas durante 2,5 min con distintos estímulos: CXCL12 (200 ng/ml), VCAM-1 (20 µg/ml) o VCAM-1 en presencia de CXCL12. Inmediatamente después fueron fijadas durante 15 min con PFA (2%), y expuestas durante 1 h a temperatura ambiente a una solución de bloqueo que contenía BSA 3%, suero humano 2% y 20 mM glicina en PBS. A continuación, se incubaron con los anticuerpos primarios (5 µg/ml) durante 30 min a temperatura ambiente, y tras lavarse con PBS se añadió el anticuerpo secundario (5 µg/ml), incubándose 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras fueron fijadas otra vez con PFA al 2%. Se procedió a la captura de las imágenes utilizando un objetivo de inmersión en aceite de 100X/1.4NA de un microscopio confocal de

escaneo láser (Eclipse TE2000, Nikon). Para capturar las imágenes (512x512 pixels), las muestras fueron excitadas con un láser de longitud de onda de 488 nm.

15. *Single Particle Tracking*

15.1 Preparación de las muestras

En este ensayo se analizó la difusión individual de integrinas $\beta 1$ en las membranas de las células Molt-4. Los cristales (Fluorodishes; 35 mm, World Precision Instruments) fueron incubados con Poli-L-Lisina (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 30 min. Después, las células ($8 \cdot 10^5/\text{ml}$) en medio RPMI 1640 fueron adheridas a la poli-L-Lisina durante 30 min, y las células no adheridas fueron eliminadas mediante lavados. Las muestras fueron bloqueadas durante 15 min con suero humano (2%; Jackson ImmunoResearch Lab.) en medio RPMI 1640 a 37°C. El anticuerpo monoclonal 18, el cual reconoce todas las integrinas $\beta 1$ independientemente de su estado de activación, se conjugó con las partículas fluorescentes Quantum Dots (QDots; Invitrogen) durante 2 h a 4°C. A continuación, las integrinas $\beta 1$ fueron marcadas con el conjugado a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, durante 3 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la muestra fue lavada con medio RPMI 1640 sin suplementos.

Durante los experimentos, las células Molt-4 fueron estimuladas con CXCL12 (200ng/ml) o el ligando VCAM-1 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), y las imágenes fueron tomadas antes y después de la estimulación. Las imágenes tomadas antes de la estimulación fueron usadas como experimentos control sin estímulo.

15.2 Adquisición de imágenes

Las muestras fueron excitadas usando un láser de Argón mediante iluminación oblicua, de modo que las muestras se excitaron ligeramente por encima de la superficie del cristal, minimizando de esta manera los artefactos potenciales asociados con la proximidad de la membrana celular a la poli-L-lisina tapizada sobre el cristal. La adquisición de imágenes fue realizada en un microscopio invertido (IX70, Olympus) con un objetivo de inmersión en aceite con una apertura numérica de 1.45 (FLAPON 60x0TIRFM, Olympus), con una exposición cada 16,41 ms (ratio de *frame* de 60,9 Hz). La fluorescencia de emisión de los QDots (655 nm) fue separada de la luz de excitación usando un espejo

dicroico (Semrock, FF500/646-Di01). La temperatura y el CO_2 se mantuvieron a 37°C y 5%, respectivamente, durante la adquisición de imágenes en un incubador construido alrededor del microscopio.

15.3 Análisis de las trayectorias

Las trayectorias de las integrinas $\beta 1$ en dos dimensiones en el plano focal fueron reconstruidas basadas en un algoritmo de MatLab. Sólo las trayectorias más largas de 13 imágenes (o *frames*) fueron tenidas en cuenta en el análisis. Para cada trayectoria individual se generó una curva de difusión en la que se representó el desplazamiento cuadrático medio (MSD (*Mean Square Displacement*)) frente al tiempo. El coeficiente de difusión de cada **trayectoria molecular** fue calculado realizando un ajuste lineal, desde el segundo al cuarto punto (D_{2-4}) al modelo lineal $\langle r^2 \rangle = 4Dt$, de donde se deduce que la pendiente de la curva ajustada será $p=4D$. A continuación se representaron los coeficientes de difusión de las trayectorias de las integrinas $\beta 1$ en diferentes células en un histograma semi-logarítmico utilizando el modelo mostrado en la **Figura 20**.

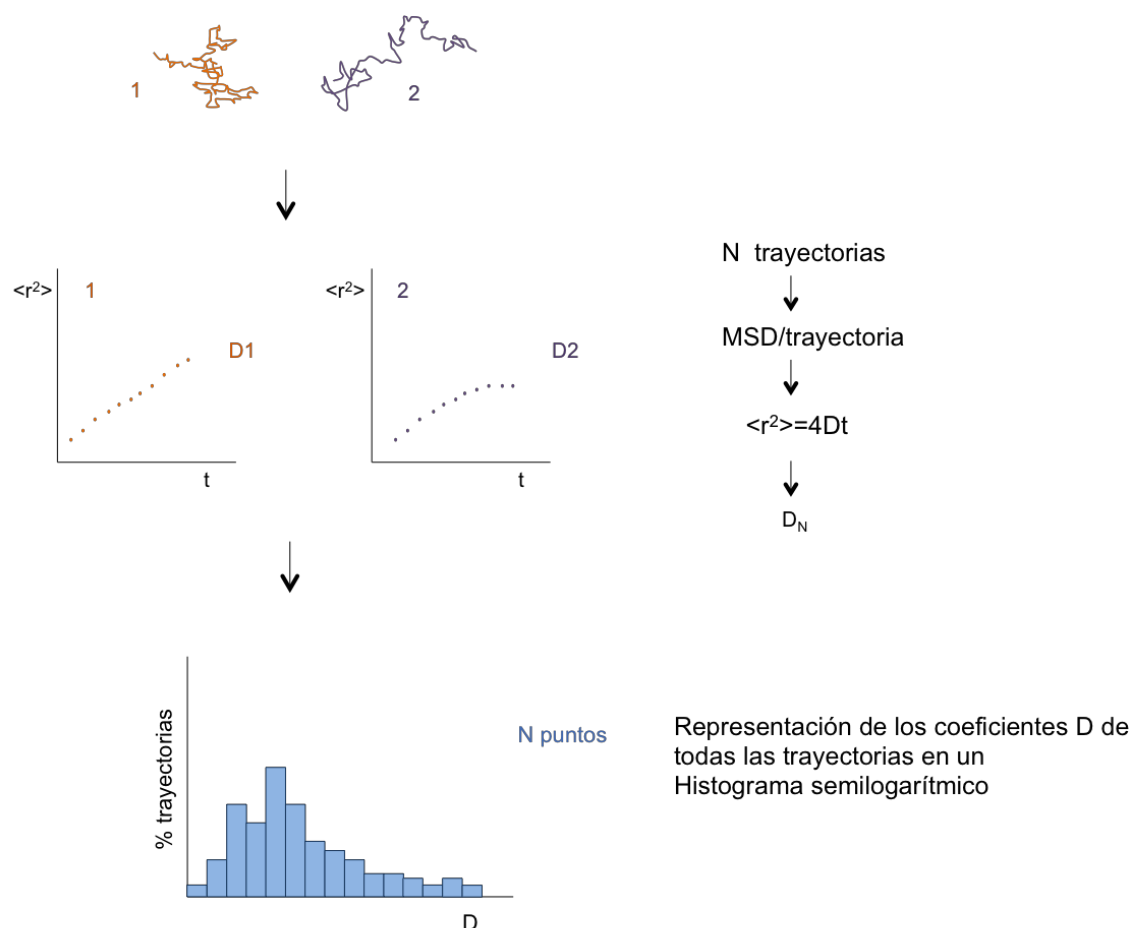


Figura 20. Modelo del análisis de las trayectorias individuales de las integrinas $\beta 1$ gracias a un algoritmo de MatLab. Para cada trayectoria individual (N) se representa el desplazamiento cuadrático medio (MSD) $\langle r^2 \rangle$ frente al tiempo, realizándose un ajuste lineal desde el segundo al cuarto punto (D_{2-4}). Gracias a éste se obtiene el coeficiente de difusión D_N de cada una de las N trayectorias individuales. Posteriormente los coeficientes de difusión de todas las trayectorias se representa en un histograma semi-logarítmico.

Posteriormente se realizó una representación del promedio de las MSD de la población molecular móvil. El coeficiente de difusión D medio fue entonces obtenido ajustando la curva con un modelo teórico no lineal representado por la ecuación $\langle r^2 \rangle = 4Dt^\alpha$, donde: $\langle r^2 \rangle$ es el desplazamiento cuadrático medio; D es el coeficiente de difusión medio de la **población móvil** y el parámetro α indica el tipo de difusión. Así, $\alpha=1$ indica difusión normal; $\alpha<1$ subdifusión y $\alpha>1$ superdifusión (**Figura 21**).

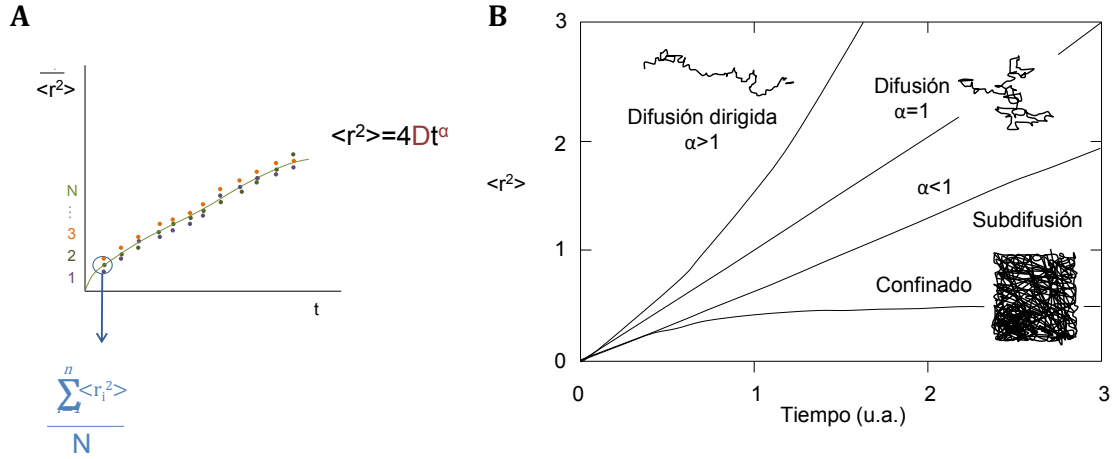


Figura 21. Modelo del cálculo de los desplazamientos cuadráticos medios promediados en cada punto de todas las trayectorias en función del tiempo (A) y representación de las formas analíticas de los diferentes tipos de difusión (B).

Adicionalmente, para averiguar el comportamiento difusivo a tiempos largos de las trayectorias móviles de $\beta 1$, se llevó a cabo un análisis de distribución CPD (*Cumulative Probability Distribution*). Este análisis permitió distinguir dos subpoblaciones dentro de la población móvil $\beta 1$: lenta y rápida. La CPD se ajustó al siguiente modelo de dos componentes:

$$P(r^2, t) = 1 - \left[f \exp\left(-\frac{r^2}{r_1^2}\right) + (1 - f) \exp\left(-\frac{r^2}{r_2^2}\right) \right]$$

Donde P es la probabilidad de encontrar una partícula en un círculo de radio r , en un determinado lapso de tiempo t ; f es la fracción lenta; $(1-f)$ corresponde a la fracción rápida; r_1 y r_2 son los MSD para las respectivas fracciones. Para cada lapso de tiempo fijado, el ajuste de la CPD proporciona los correspondientes valores r_1 y r_2 . Finalmente, el coeficiente de difusión de cada fracción (lenta y rápida) se determina realizando un ajuste a las curvas de MSD (r_1 y r_2) con el modelo teórico $\langle r^2 \rangle = 4Dt^\alpha$.

16. Análisis estadístico

La prueba T de Student fue utilizada para analizar las diferencias estadísticamente significativas entre medias de pares de datos. Para tres o más condiciones, los datos fueron analizados mediante análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un análisis de comparación múltiple de Tukey-Kramer. En ambos tipos de análisis, el nivel de significación fue $p < 0,05$. Las diferencias significativas fueron representadas como **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ y * $p < 0,05$.

Nombre	Componentes
Solución de lisis GST-FISH	1% Nonidet P-40, 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl ₂ , 10% glicerol, 1 mM PMSF, 10 µM Na ₃ VO ₄ , 2 µM NaF, en presencia de un cóctel de inhibidores de proteasas (1 µg/ml) (Roche Applied Science)
Solución de lisis para inmunoprecipitación	0,5% NP-40, 20 mM trietanolamina pH 8,0, 300 mM NaCl, 2 mM EDTA, 20% glicerol, 1 mM PMSF, 1 µg/ml Leupeptina, 1 µg/ml Aprotinina, 10 µM Na ₃ VO ₄ y 2 µM NaF
Solución de carga	2% SDS, 10% glicerol, 100 mM DTT, 100 mM Tris-HCl pH 6,8
Solución de bloqueo	TBS con 3% de BSA
Solución de <i>stripping</i>	100 mM 2-β-mercaptoetanol, 2% SDS y 62,5 mM Tris-HCl pH 6,7
Buffer hipotónico de extracción	40 µg/ml digitonina, 5 mM Tris pH 7,5, 10 mM NaCl, 0,5 mM MgCl ₂ , 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 5 µg/ml aprotinina, 10 µg/ml leupeptina, 1 mM PMSF, 1 mM Na ₃ VO ₄
Solución de lisis B en ensayos de fraccionamiento celular	0,2% NP-40, 10 mM Tris pH 7,5, 40 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 5 µg/ml aprotinina, 10 µg/ml leupeptina, 1 mM PMSF, 1 mM Na ₃ VO ₄
Solución de unión de VCAM-1-Fc	HBSS (Gibco Invitrogen), suplementado con 2% FBS
Medio de unión a Anexina V	10 mM HEPES pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl ₂
Solución de lisis bacteriana	150 mM NaCl pH 7,5, 50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 1% Tritón X-100, 2mM PMSF, 2,5 µg/ml leupeptina y 10 µg/ml aprotinina
Solución de elución A	5 mM glutation (Sigma-Aldrich), 50 mM Tris-HCl y 0,2 M PMSF
Solución de elución B	500 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,4 y 1mM PMSF
Solución de tapizado	0,1 M NaHCO ₃ , pH 8,8

Tabla 8. Soluciones utilizadas en los diferentes ensayos.

Resultados

1. Papel de SLP-76, ADAP0 Y SKAP-1 en la regulación de la adhesión dependiente de $\alpha 4 \beta 1$ en respuesta a quimioquinas

La estimulación por quimioquinas de las integrinas de los linfocitos T es un paso crucial en el tráfico linfocitario. La proteína adaptadora Vav1 es requerida durante la señalización *inside-out* activada por quimioquinas que conduce a la estimulación de la adhesión de linfocitos T mediada por $\alpha 4 \beta 1$ ^{187,188}. Vav1 presenta múltiples sitios de unión a diferentes proteínas, por lo que potencialmente algunas de estas proteínas podrían participar en esta señalización *inside-out*. Una de las proteínas que se unen a Vav1 es SLP-76, la cual juega un importante papel en la activación de los linfocitos T tras estimulación del TCR^{235,236}. A su vez, SLP-76 interacciona con ADAP, una proteína involucrada en la señalización *inside-out* que regula a las integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$ tras estimulación del TCR^{270,278}. El papel de SLP-76 y ADAP ha sido mayoritariamente estudiado en la adhesión de linfocitos T mediada por integrinas después de la activación del TCR. Sin embargo, se conoce poco acerca de su papel en el control de la adhesión en respuesta a quimioquinas.

1. Papel de SLP-76 y ADAP en la estimulación por quimioquinas de la adhesión de linfocitos T mediada por $\alpha 4 \beta 1$

Tras la activación del TCR, SLP-76 es fosforilado por ZAP-70 en un residuo tirosina, lo que permite su unión al dominio SH2 de Vav1^{240,241,294}, mientras el dominio SH2 de SLP-76 interacciona con las tirosinas fosforiladas de ADAP^{240,295,296}. Para estudiar si las asociaciones entre Vav1, SLP-76 y ADAP podrían estar estimuladas por la quimioquina CXCL12, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación utilizando anticuerpos anti-SLP-76 en la línea celular T Molt-4. Dichos ensayos mostraron que CXCL12 estimula la asociación de SLP-76 con Vav1 y ADAP de una forma rápida y transitoria (**Figura 22**). Confirmando trabajos anteriores, talina fue asimismo co-inmunoprecipitada con el anticuerpo anti-SLP-76²⁹⁷, y se observó que CXCL12 aumenta moderadamente dicha asociación. Por contra, la subunidad $\beta 1$ no fue inmunoprecipitada con los anticuerpos anti-SLP-76 (datos no mostrados).

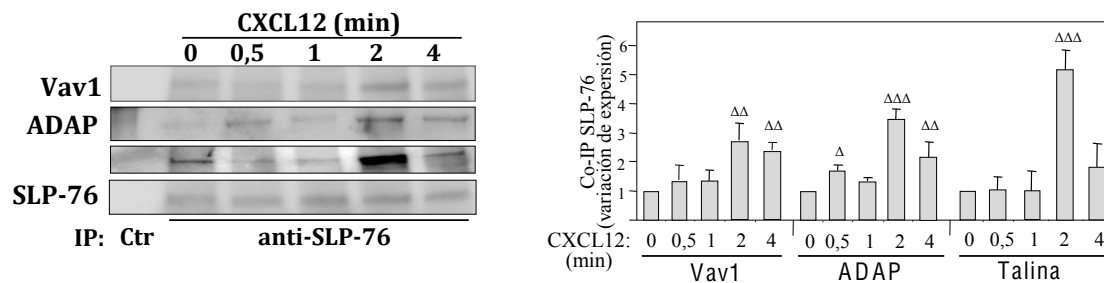


Figura 22. Dinámica de las asociaciones de SLP-76 con Vav1 y ADAP en respuesta a CXCL12. **(Izquierda)** Las células Molt-4 fueron estimuladas con CXCL12 (200 ng/ml) durante los tiempos indicados. Los lisados fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-SLP-76, seguido de análisis mediante *western blot* utilizando anticuerpos frente a las proteínas mostradas. **(Derecha)** Cuantificación densitométrica de las bandas referidas a la carga analizada con anticuerpos anti-SLP-76 (n=6, $\Delta\Delta\Delta$ p<0,001, $\Delta\Delta$ p<0,01, Δ p<0,05).

Para estudiar las posibles conexiones entre SLP-76, Vav1 y ADAP en la estimulación por quimioquinas de la adhesión de linfocitos T mediada por $\alpha 4\beta 1$, analizamos inicialmente la asociación entre Vav1 y SLP-76 en células Molt-4 y en linfocitos T silenciados mediante RNA de interferencia para ADAP. El silenciamiento de ADAP fue más eficaz con el siRNA ADAP #2 que con siRNA ADAP #1, y por tanto usamos éste para realizar los posteriores análisis funcionales (**Figura 23A**). En experimentos control observamos que la depleción de ADAP no afectaba la viabilidad celular, ni tampoco la expresión de CXCR4, $\alpha 4$ o $\beta 1$ (datos no mostrados). Análisis de la asociación basal Vav1-SLP-76 reveló que no existían diferencias significativas tras el silenciamiento de ADAP. Sin embargo, el aumento de esta asociación en presencia de CXCL12 fue de menor magnitud en las células deplecionadas por ADAP, sugiriendo que un nivel crítico de la expresión de ADAP y/o su localización es necesario para aumentar la asociación Vav1-SLP-76 (**Figura 23B**).

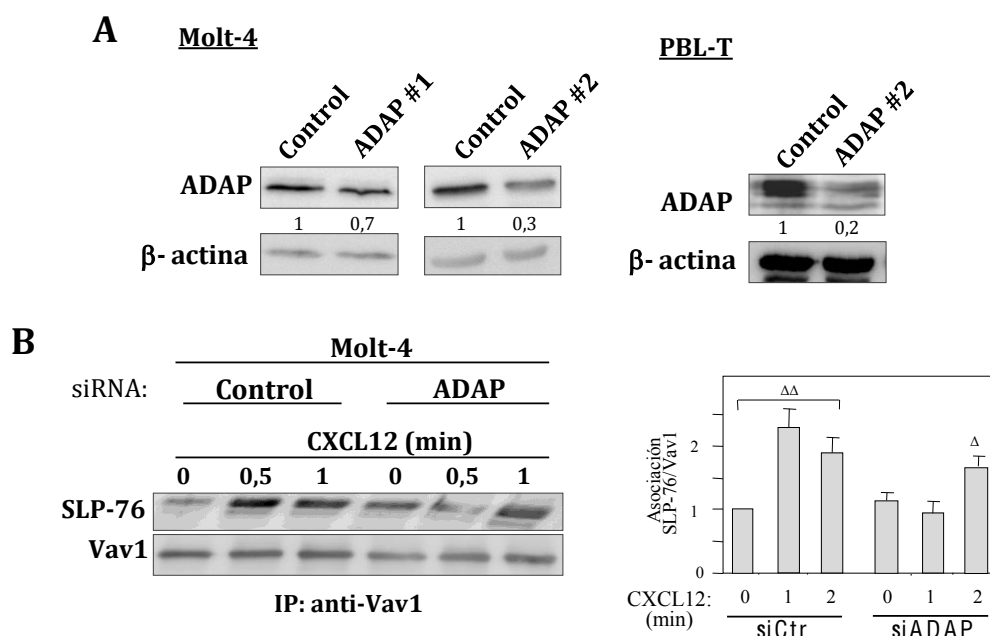


Figura 23. Dinámica de la asociación de Vav1 con SLP-76 en células silenciadas para ADAP. **(A)** Las células Molt-4 fueron transfectadas con siRNA Control o con dos diferentes siRNA para ADAP. La expresión de ADAP fue analizada por *immunoblotting*, utilizándose la actina como control de carga. **(B)** Los transfectantes indicados fueron pre-incubados con CXCL12 durante los tiempos mostrados, y tras lisarlos, los extractos celulares fueron sometidos a ensayos de inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-Vav1, y después analizados mediante *western blot*. Se muestra asimismo la cuantificación densitométrica de las bandas referidas a la carga analizada con anticuerpos anti-Vav1 (^{ΔΔ} $p < 0,01$, ^Δ $p < 0,05$).

Para los ensayos de adhesión, además de los transfectantes deplecionados para ADAP, utilizamos células silenciadas para SLP-76, lo cual se obtuvo utilizando un *pool* de oligos de siRNA dirigido a silenciar esta proteína (*Smart pool*, Dharmacon) (**Figura 24A**). La estimulación de la adhesión de células T por las quimioquinas es rápida y transitoria¹⁴, por lo que los ensayos de adhesión estática a los ligandos de $\alpha 4\beta 1$ co-inmovilizados con quimioquinas fueron realizados usando tiempos de incubación cortos (2 min), después de una breve centrifugación (5 segundos) para promover el inmediato contacto de las células con sus ligandos. Bajo estas condiciones, observamos que las células Molt-4 y PBL-T deplecionadas para SLP-76 exhibían una modesta reducción en la adhesión sobre FN-H89 (CS-1/FN) (**Anexo I**), mientras su adhesión a VCAM-1 mostraba una pequeña disminución no significativa en comparación con los transfectantes siRNA control (**Figura 24B**). De forma similar, las células Jurkat J14 deficientes en SLP-76 mostraron una adhesión a VCAM-1 estimulada por CXCL12 comparable a las células Jurkat parentales, mientras la adhesividad de las células Jurkat JCam deficientes en Lck fue completamente eliminada, confirmando resultados

anteriores²⁹⁸ (**Figura 24C**). Cuando analizamos la adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$ en células silenciadas para ADAP, observamos una reducción notable de su adhesión en respuesta a CXCL12 comparado con los transfectantes control (**Figura 24B**). Asimismo, dicha reducción fue consistentemente mayor en los transfectantes deplecionados para ADAP que en aquellos silenciados para SLP-76. Adicionalmente, las células Molt-4 deficientes en ADAP exhibieron una sustancial inhibición de la migración transendotelial mediada por $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a CXCL12, mientras que los transfectantes silenciados para SLP-76 y las células Jurkat J14 mostraban un impedimento parcial en dicha migración (**Figura 24D**).

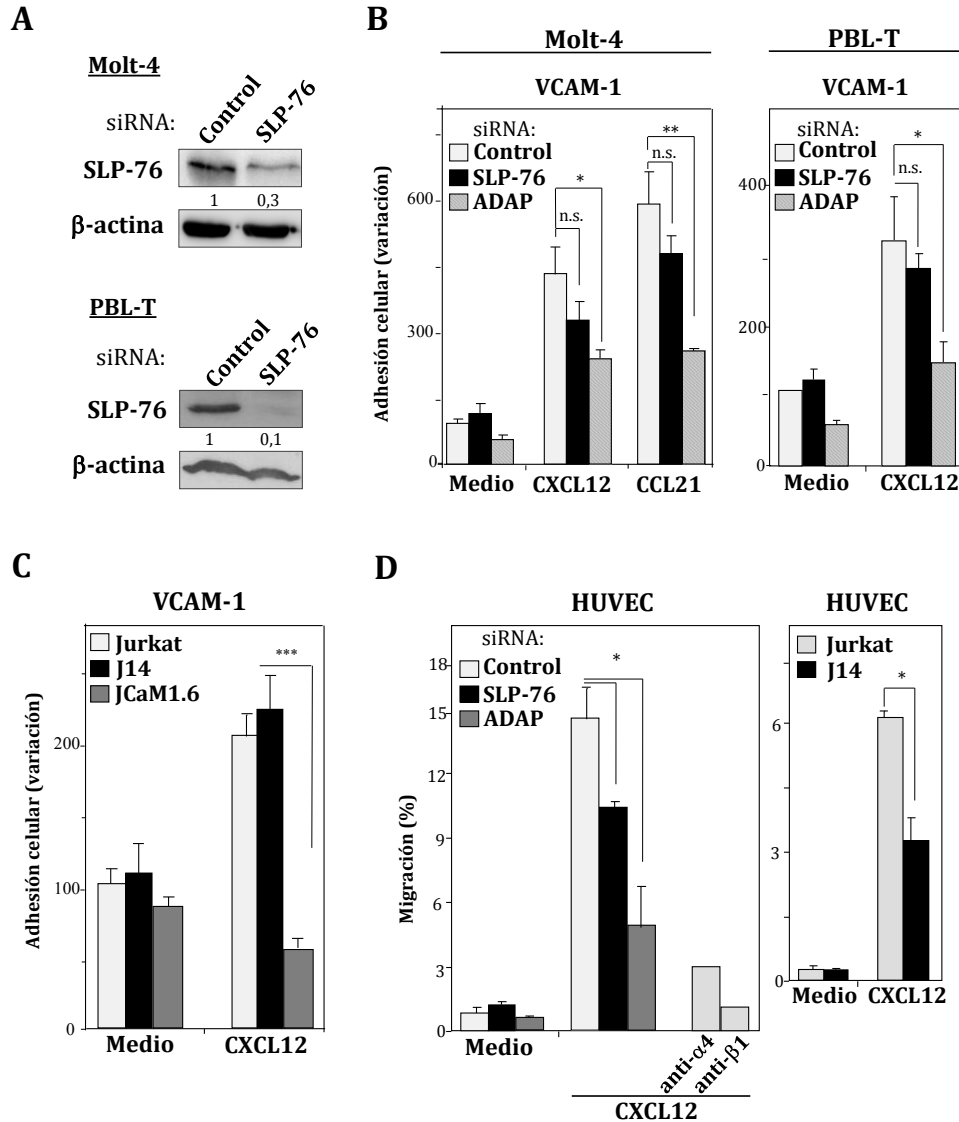


Figura 24. Papel de SLP-76 y ADAP en la adhesión y migración transendotelial de células T dependiente de $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a CXCL12. **(A)** Las células Molt-4 fueron transfectadas con siRNA Control o SLP-76, y la expresión de SLP-76 fue analizada por *immunoblotting*. Como control de carga se utilizó la actina. **(B)** Las células Molt-4 y PBL-T fueron transfectadas con los siRNA indicados, y posteriormente utilizadas en ensayos de adhesión estática a VCAM-1 en ausencia (Medio) o presencia de CXCL12 o CCL21 (n=3-5). **(C)** Las células Jurkat, J14 y JCaM1.6 fueron sometidas a ensayos de adhesión a VCAM-1 inmovilizado en ausencia o presencia de CXCL12 (n=2). **(D)** Los transfectantes Molt-4, así como las células Jurkat y J14, se sometieron a ensayos de migración a través de monocapas de HUVEC tratadas con TNF- α (n=3). (**p<0,01 o ***p<0,001; n.s., no significativo).

A continuación se hicieron experimentos de adhesión en condiciones de flujo (1 dina/cm²) usando células deplecionadas para SLP-76 o ADAP, distinguiendo aquellas células que se adherían de forma estable sobre VCAM-1 co-inmovilizado con CXCL12 (más de 20 s), de aquellas que hacían *rolling*. Los resultados revelaron que los transfectantes Molt-4 y PBL-T silenciados para estas proteínas mostraban una disminución entre 40-75% de la adhesión estable sobre

VCAM-1/CXCL12 comparado con los transfectantes control (**Figura 25, izquierda, centro**). Confirmando la participación de SLP-76, las células J14 exhibieron asimismo una reducción significativa en la adhesión estable con respecto a las células Jurkat parentales (**Figura 25, derecha**). Los resultados indican que la contribución de SLP-76 en la adhesión linfocitaria a VCAM-1 estimulada por quimioquinas es especialmente relevante bajo condiciones de flujo, pero difícilmente detectable en condiciones estáticas, de forma similar a lo observado en la adhesión dependiente de α L β 2 sobre ICAM-1²⁶⁴.

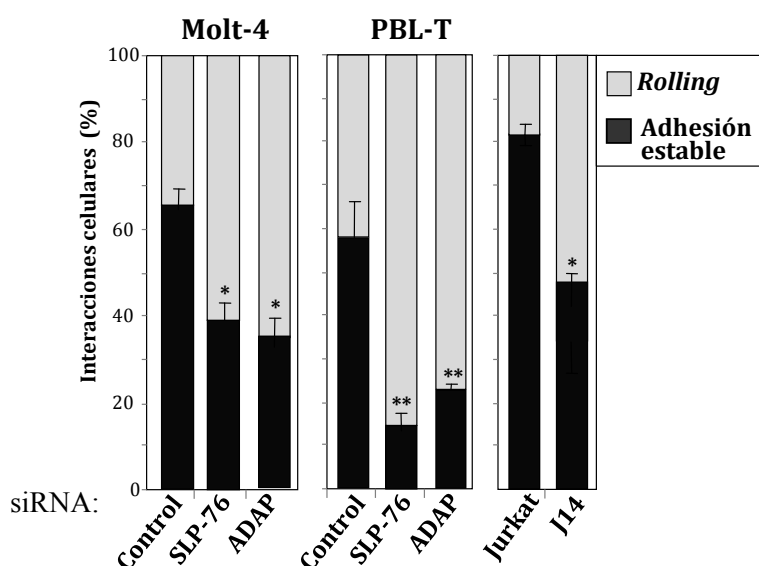


Figura 25. Papel de SLP-76 y ADAP en la adhesión en condiciones de flujo de células T a VCAM-1 en respuesta a CXCL12. Las células Molt-4 (**izquierda**) o PBL-T (**centro**) transfectadas con los siRNA indicados, o células Jurkat y J14 (**derecha**), fueron perfundidas en cámaras de flujo tapizadas con VCAM-1 y CXCL12, y analizadas para adhesión estable y *rolling*. Los datos representan la media \pm SD del porcentaje de células que realizaron *rolling* y adhesión estable respecto de la población total de células que llevaron a cabo alguno de estos tipos de interacciones (n=3-4, * p<0,05, **p<0,01).

2. La adquisición de conformaciones de alta afinidad de α 4 β 1 tras la estimulación con CXCL12 es independiente de SLP-76 y ADAP

La disminución observada en la adhesión a VCAM-1 tras la depleción de SLP-76 y ADAP podría deberse a alteraciones en la adquisición de conformaciones de alta afinidad de α 4 β 1. Para analizar si el silenciamiento de estas proteínas afectaba a la afinidad de α 4 β 1, usamos HUTS-21, un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítipo de activación de integrinas β 1²⁹⁹. Los análisis mediante citometría de flujo indicaron que los transfectantes deficientes en SLP-76 o ADAP

retenían niveles de unión a HUTS-21 similares a los transfectantes control (**Figura 26A**). Experimentos control utilizando manganeso, un inductor de conformaciones de alta afinidad de las integrinas, revelaron que el grado de unión de HUTS-21 a los distintos transfectantes expuestos a dicho ión no estaba afectado por el silenciamiento de SLP-76 o ADAP (datos no mostrados). Estos resultados indican que la estimulación por quimioquinas de formas de alta afinidad de $\alpha 4\beta 1$ no requiere las funciones de SLP-76 o ADAP.

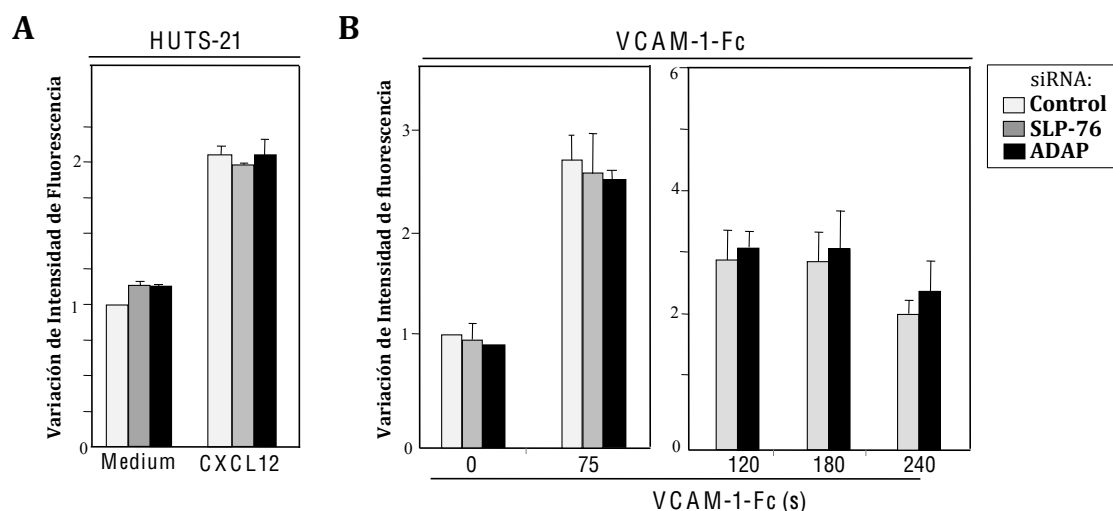


Figura 26. Papel de SLP-76 y ADAP en la regulación de la afinidad y avididad de $\alpha 4\beta 1$. Las células Molt-4 silenciadas con los siRNA indicados fueron incubadas en presencia o ausencia de CXCL12 o Mn^{2+} antes de añadir el anticuerpo HUTS-21 (**A**), o VCAM-1-Fc (**B**). La unión de estos reactivos fue detectada por citometría de flujo.

Para realizar un examen más a fondo de la implicación de estas proteínas en los primeros pasos de la adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$, realizamos ensayos de citometría de unión celular a VCAM-1-Fc con el fin de determinar la eficiencia de la interacción de $\alpha 4\beta 1$ con su ligando en ausencia de *spreading* celular. Para estos ensayos se utilizaron tiempos cortos de estimulación con CXCL12 (30 s), seguido de la incubación con VCAM-1-Fc desde 75 hasta 240 s. Los resultados revelaron niveles de unión $\alpha 4\beta 1$ /VCAM-1-Fc similares entre las células silenciadas para SLP-76 o ADAP con respecto a los transfectantes control (**Figura 26B**). Experimentos control mostraron que dicha unión fue inhibida hasta un 80% por la toxina pertúsica (datos no mostrados), y que todos los transfectantes presentaban valores de unión a VCAM-1-Fc comparables en presencia de manganeso (**Anexo I**). En conjunto, estos datos indican que SLP-76 y ADAP no regulan las etapas iniciales de adhesión de linfocitos T mediada por $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a CXCL12.

3. Papel de SLP-76 y ADAP en el reforzamiento de la adhesión y *spreading* celular mediado por $\alpha 4 \beta 1$

Tras la generación de conformaciones de alta afinidad y avidéz de las integrinas leucocitarias que favorecen una interacción firme con sus ligandos, dichas interacciones se refuerzan como paso previo al *spreading* celular²⁷. Para analizar la fuerza de la adhesión dependiente de $\alpha 4 \beta 1$ de los transfectantes silenciados para SLP-76 o ADAP, sometimos a las células adheridas sobre VCAM-1/CXCL12 en cámaras de flujo a aumentos secuenciales del flujo desde 1 a 10 dinas/cm². Los transfectantes de PBL-T o células Molt-4 deplecionados para estas proteínas, así como las células J14 exhibieron menor resistencia a despegarse a altas intensidades de flujo que los transfectantes control (**Figura 27A, B**). De forma consistente, observamos que el silenciamiento de ADAP se tradujo en mayores niveles de pérdida de fuerza de adhesión que los transfectantes deficientes en SLP-76.

El análisis del *spreading* de los transfectantes silenciados para SLP-76 y ADAP en las células Molt-4 y PBL-T mostró una reducción de su capacidad de *spreading* sobre VCAM-1/CXCL12 con respecto a los transfectantes control (**Figura 27C**). Estos datos sugieren que ADAP regula el reforzamiento de la adhesión de linfocitos T dependiente de $\alpha 4 \beta 1$ en respuesta a quimioquinas, así como el posterior paso de *spreading* celular, mientras SLP-76 contribuye especialmente al *spreading*, con un papel menor en el reforzamiento de dicha adhesión.

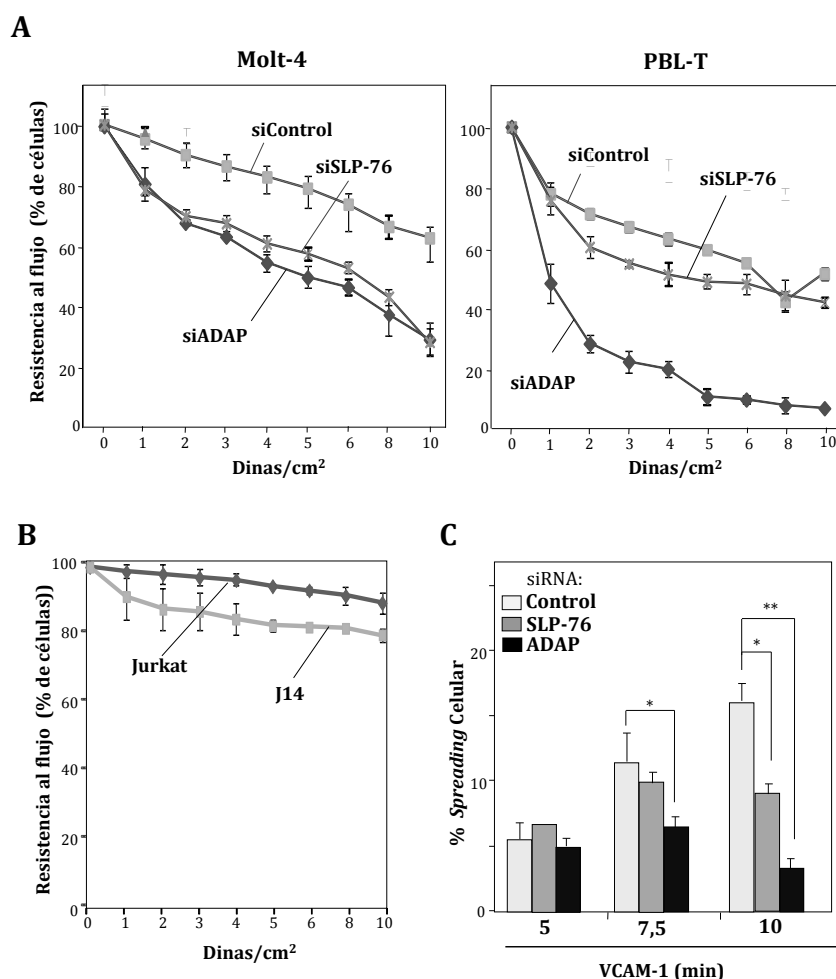


Figura 27. Papel de SLP-76 y ADAP en el reforzamiento de la adhesión *spreading* de linfocitos T a VCAM-1 en respuesta a CXCL12. **(A, B)** Los transfectantes y células indicadas fueron perfundidas en cámaras de flujo que contenía VCAM-1 coinmovilizado con CXCL12. El flujo fue detenido permitiéndose la sedimentación de las células. A continuación, las células se expusieron a incrementos progresivos de la intensidad de flujo para determinar la resistencia de la adhesión celular. Los datos representan la media \pm SD del porcentaje de células que permanecieron adheridas en cada incremento de flujo, respecto del número inicial de células adheridas antes de aplicar el flujo. **(C)** Los transfectantes fueron sometidos a ensayos de *spreading* celular sobre VCAM-1/CXCL12 durante los tiempos indicados (A, n=4; B, n=3; C, n=3; ** p<0,01, * p<0,05).

4. Papel de Rac1 en la regulación por SLP-76 y ADAP de la adhesión celular dependiente de $\alpha 4 \beta 1$ en respuesta a CXCL12

Debido a que la fuerza de la adhesión y el *spreading* celular mediados por $\alpha 4 \beta 1$ dependen de la activación de la GTPasa Rac1¹⁸⁷, estudiamos a continuación el posible papel de SLP-76 y ADAP en la activación de esta GTPasa en respuesta a CXCL12. La incubación de transfectantes control con dicha quimioquina se tradujo en una activación transitoria de Rac1, la cual mostró menor eficiencia en las células

Molt-4 silenciadas para SLP-76 (**Figura 28A**). De modo similar, la activación de Rac1 en las células Jurkat J14 fue deficiente comparada con las células Jurkat parentales (**Figura 28B**). Notablemente, las células Molt-4 deplecionadas para ADAP mostraron un bloqueo de la activación de Rac1 tras la estimulación con CXCL12 (**Figura 28C**). Adicionalmente, la inhibición de la activación de Rac1 en los transfectantes silenciados para SLP-76 o ADAP fue asociada con una inhibición de la estimulación por CXCL12 de la polimerización de F-actina (**Anexo I**).

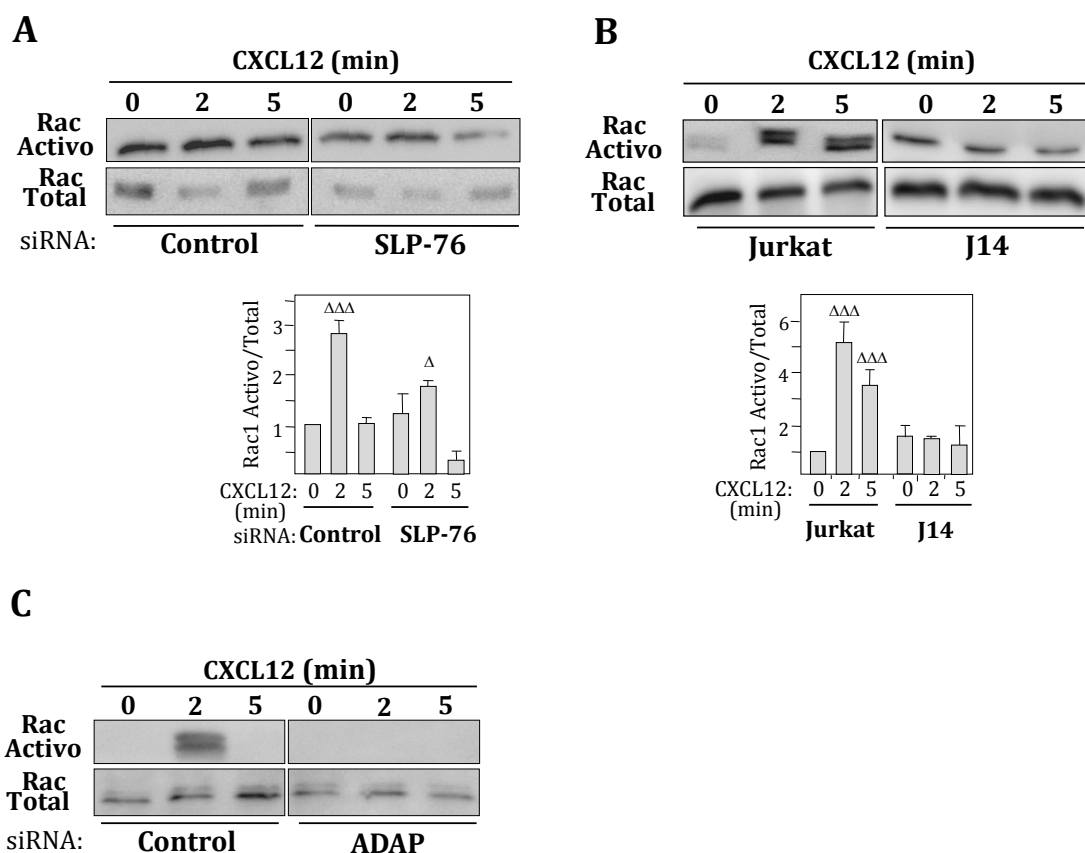


Figura 28. Papel de SLP-76 y ADAP en la activación de Rac1 por CXCL12. Las células Molt-4 transfectadas con los siRNAs indicados (**A, C**), y las células Jurkat y J14 (**B**) fueron expuestas a CXCL12 durante los tiempos mostrados y posteriormente analizadas en ensayos GTPasa para medir la activación de Rac. (A, n=7; B, n=3; C, n=3; ^{ΔΔΔ} p<0,001, ^Δ p<0,05).

La estimulación por quimioquinas de la activación de Rac1 en células T es dependiente de la previa fosforilación de Vav1¹⁸⁷. En células silenciadas para SLP-76 se observó que la inhibición de la activación de Rac estaba asociada con un menor grado de fosforilación de Vav1 y menos mantenido en el tiempo comparado con los transfectantes control (**Figura 29A**). Por contra, el silenciamiento de ADAP no se tradujo en alteraciones en dicha fosforilación, de forma similar a lo observado en linfocitos de ratones ADAP *knock out*²²⁷. De manera análoga a las

células Molt-4, la depleción de SLP-76 en las células PBL-T condujo a una ineficiente fosforilación de Vav1 en respuesta a CXCL12, mientras dicha fosforilación permaneció inalterada tras el silenciamiento de ADAP (**Figura 29B**).

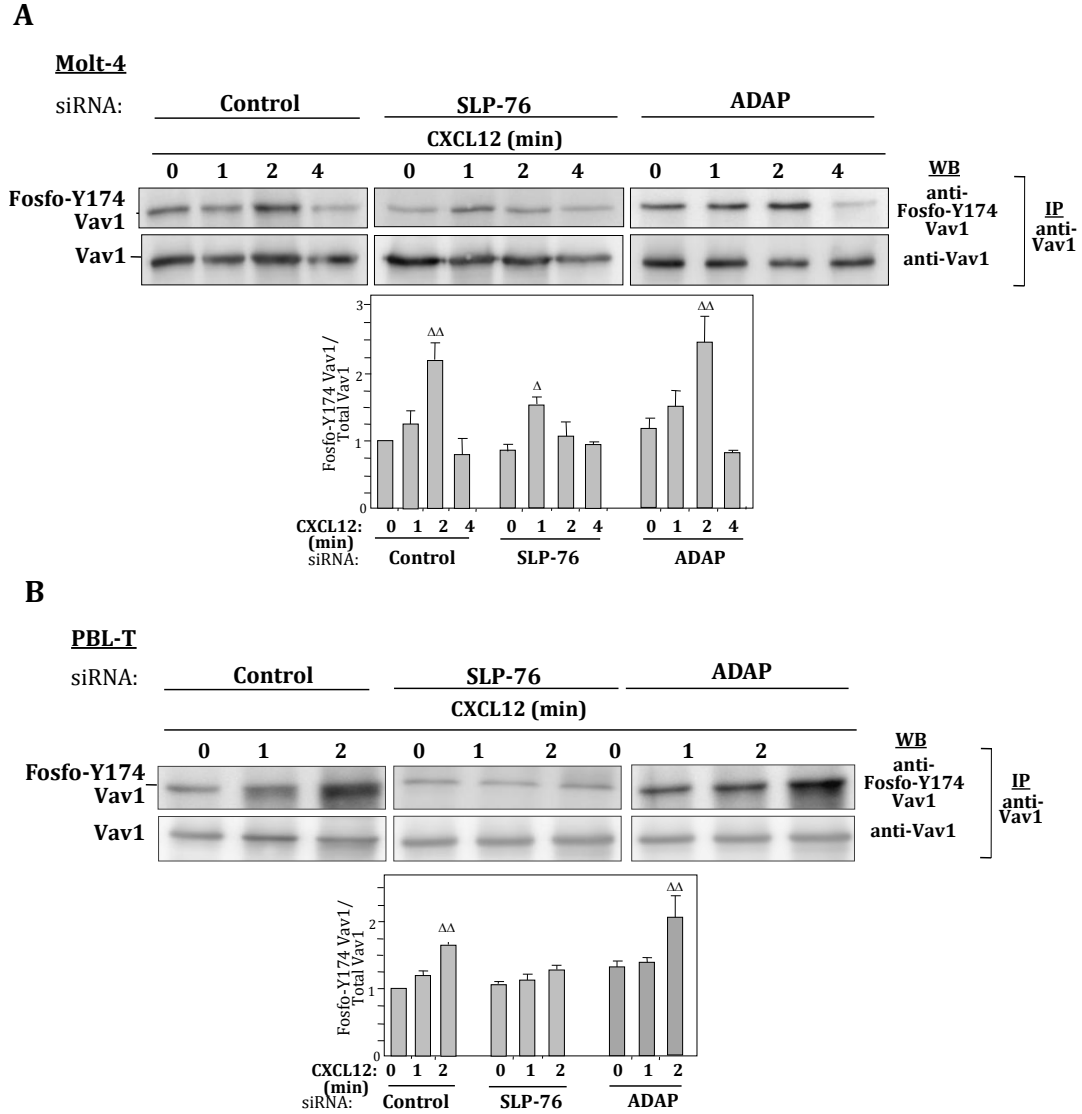


Figura 29. Papel de SLP-76 y ADAP en la fosforilación de Vav1 en respuesta a CXCL12. Las células Molt-4 y PBL-T silenciadas con los siRNAs indicados fueron incubadas con CXCL12 durante los tiempos mostrados. Tras la solubilización, los extractos celulares se analizaron mediante *western blotting* para detectar la fosforilación en la tirosina Y174 de Vav1 (A, n=6; B, n=2; ^{ΔΔ} p<0,05, ^Δ p<0,05).

Con el fin de analizar la posible relación entre la activación deficiente de Rac1 y la inhibición de la adhesión mostrada por las células T silenciadas para SLP-76 o ADAP, transfectamos la forma constitutivamente activa de Rac fusionada a GFP (pEGFP-Rac V12) en las células J14 y Jurkat parentales, así como GFP-Rac V12 junto con siRNA para ADAP en células Molt-4. Posteriormente los transfectantes

fueron analizados en experimentos de adhesión sobre VCAM-1 co-inmovilizado con CXCL12. Los ensayos de adhesión en flujo revelaron que la menor adhesión estable mostrada por las células Jurkat J14 transfectadas con pEGFP comparado con las células Jurkat parentales transfectadas con el mismo vector era significativamente rescatada tras la expresión de pEGFP-Rac V12 (**Figura 30A**). De modo similar, observamos que la expresión de pEGFP-Rac V12 revertía los efectos inhibitorios del silenciamiento de ADAP en la estimulación de la adhesión celular a VCAM-1/CXCL12 (**Figura 30B**).

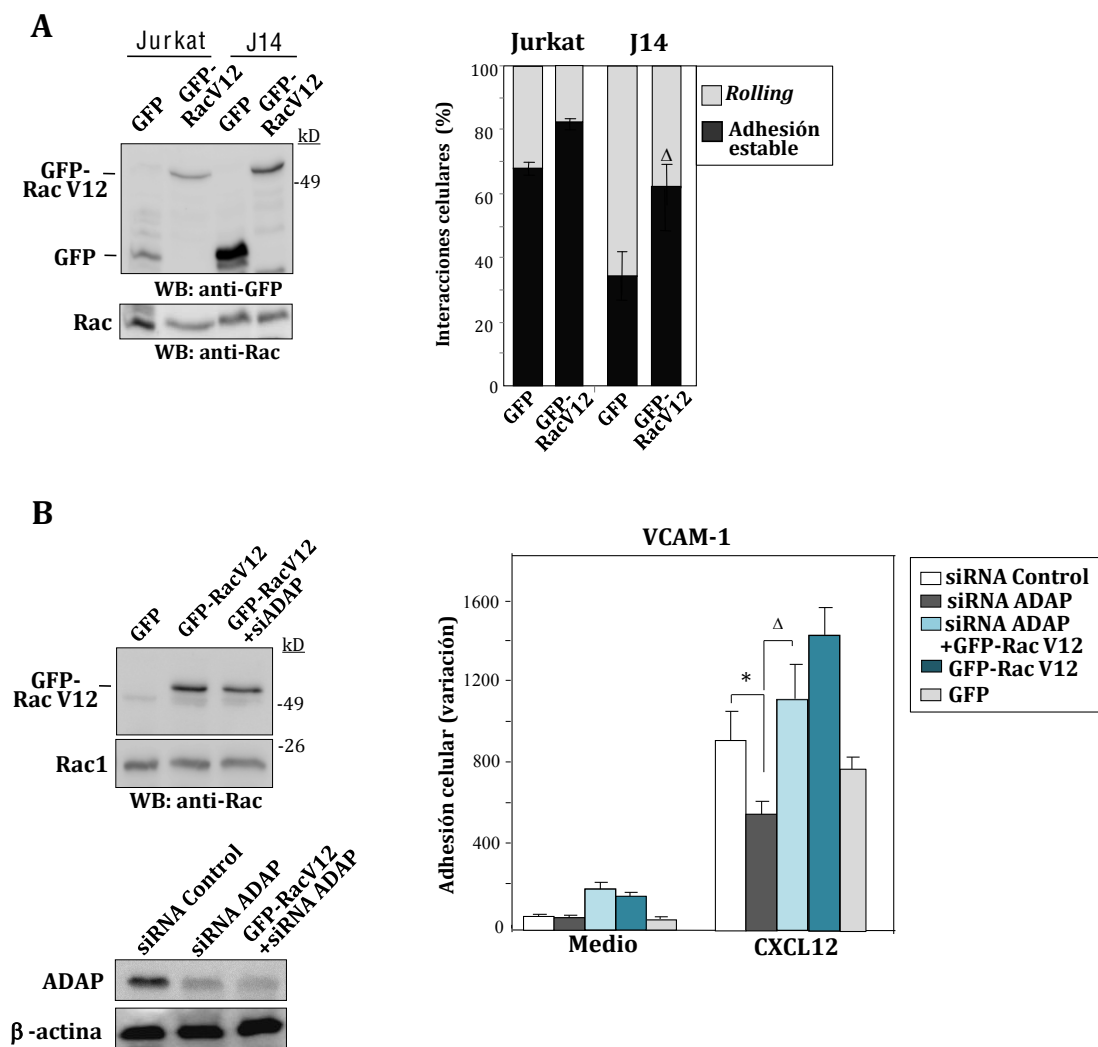


Figura 30. La regulación por SLP-76 y ADAP de la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4 \beta 1$ es mediada por la activación de Rac1. **(A)** Las células fueron transfectadas con los vectores indicados, y posteriormente analizadas por *western blot* (*izquierda*), o sometidas a adhesión a VCAM-1/CXCL12 en condiciones de flujo. **(B)** Las células Molt-4 fueron transfectadas con los siRNA y vectores indicados, y analizadas mediante *western blot* (*izquierda*), o sometidas a adhesión estática sobre VCAM-1 en presencia o ausencia de CXCL12 (A-B, n=3). La adhesión fue significativamente inhibida (* p<0,05) o rescatada (Δ p<0,05).

5. Relaciones funcionales entre ADAP y Pyk2 en la activación de Rac y en la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4 \beta 1$ en respuesta a quimioquinas

En un estudio realizado de manera paralela en el laboratorio, se había mostrado el papel de la proteína Pyk2 como regulador negativo de la adhesión linfocitaria dependiente de $\alpha 4 \beta 1$ (**ver Anexo I**). Pyk2 es una proteína tirosín-quinasa que posee un dominio FERM en la región N-terminal homólogo a FAK (*focal adhesion kinase*)³⁰⁰, así como un dominio FAT en la región C-terminal semejante al que presenta FAK y que es responsable de la interacción FAK-talina³⁰¹. Pyk2 se activa tras estimulación del TCR y por exposición celular a quimioquinas e integrinas^{302,303}. Se ha mostrado que Pyk2 se asocia a Vav1 en linfocitos³⁰⁴, habiéndose propuesto que Pyk2 actuaría como un puente entre Vav1 y la integrina $\alpha V \beta 3$ ³⁰⁵. En ratones deficientes en Pyk2 se han observado defectos en la migración de macrófagos y en la motilidad de linfocitos B en respuesta a quimioquinas^{306,307}, así como alteraciones en la polarización celular y formación de *ruffles* celulares³⁰⁶. Habíamos observado que el silenciamiento de Pyk2 conllevaba un mayor grado de adhesión y *spreading* celular sobre ligandos de $\alpha 4 \beta 1$, sin afectar la afinidad de $\alpha 4 \beta 1$ (**Anexo I**). Asimismo, detectamos que los transfectantes deplecionados para Pyk2 mostraban una unión $\alpha 4 \beta 1$ /VCAM-1 más sostenida que los transfectantes control, sugiriendo que Pyk2 regulaba la avidéz de $\alpha 4 \beta 1$. Finalmente, nuestros datos revelaron que la ausencia de Pyk2 provocaba un aumento en la activación de Rac1 en respuesta a CXCL12 (**Anexo I**). Los resultados de la presente Tesis que el aumento en la activación de esta GTPasa no está correlacionado con una mayor fosforilación de Vav1 en los transfectantes Molt-4 y PBL-T silenciados para Pyk2, comparado con los correspondientes transfectantes control (**Figura 31A, B; Anexo I**), siendo la fosforilación de Vav1 en las células deficientes en Pyk2 ligeramente menor.

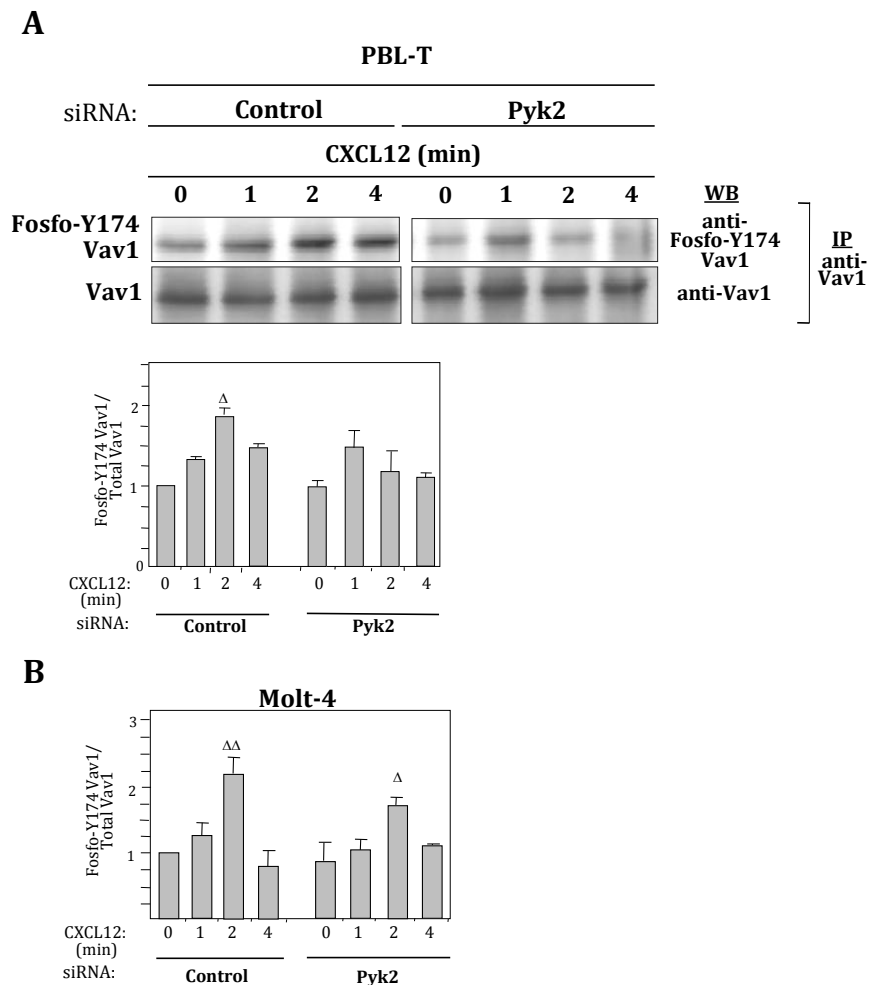


Figura 31. Papel de Pyk2 en la fosforilación de Vav1 en respuesta a CXCL12. Las células PBL-T **(A)** y Molt-4 **(B)** fueron transfectadas con los siRNA indicados y expuestas a CXCL12 durante los tiempos mostrados. Tras solubilizar las células, los extractos se analizaron por *western blotting* para detectar la fosforilación en tirosinas de Vav1. La fosforilación de Vav1 fue significativamente incrementada por CXCL12 (A, n=3; B, n=6; $\Delta\Delta$ $p<0,01$, Δ $p<0,05$).

Dado que los datos indicaban que la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a quimioquinas estaba particularmente alterada tras la depleción de ADAP o Pyk2, analizamos a continuación si existían relaciones funcionales entre estas proteínas durante el proceso de adhesión celular. Para ello silenciamos ambas proteínas en las células Molt-4 y estudiamos el efecto en la adhesión sobre VCAM-1 de los transfectantes. Los resultados revelaron que la ineficiente estimulación por CXCL12 de la adhesión mostrada por las células silenciadas para ADAP podía ser rescatada por la co-transfección con el siRNA de Pyk2, aunque los dobles transfectantes no alcanzaron los valores de adhesión exhibidos por las células transfectadas únicamente con el siRNA de Pyk2 (**Figura 32A**). Además, el aumento de la adhesión tras el silenciamiento de Pyk2 no fue

detectado cuando se transfectaron los siRNA de SLP-76 y Pyk2 combinados (**Figura 32B**), sugiriendo una respuesta cooperativa entre ADAP y SLP-76 durante la estimulación de la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4\beta 1$.

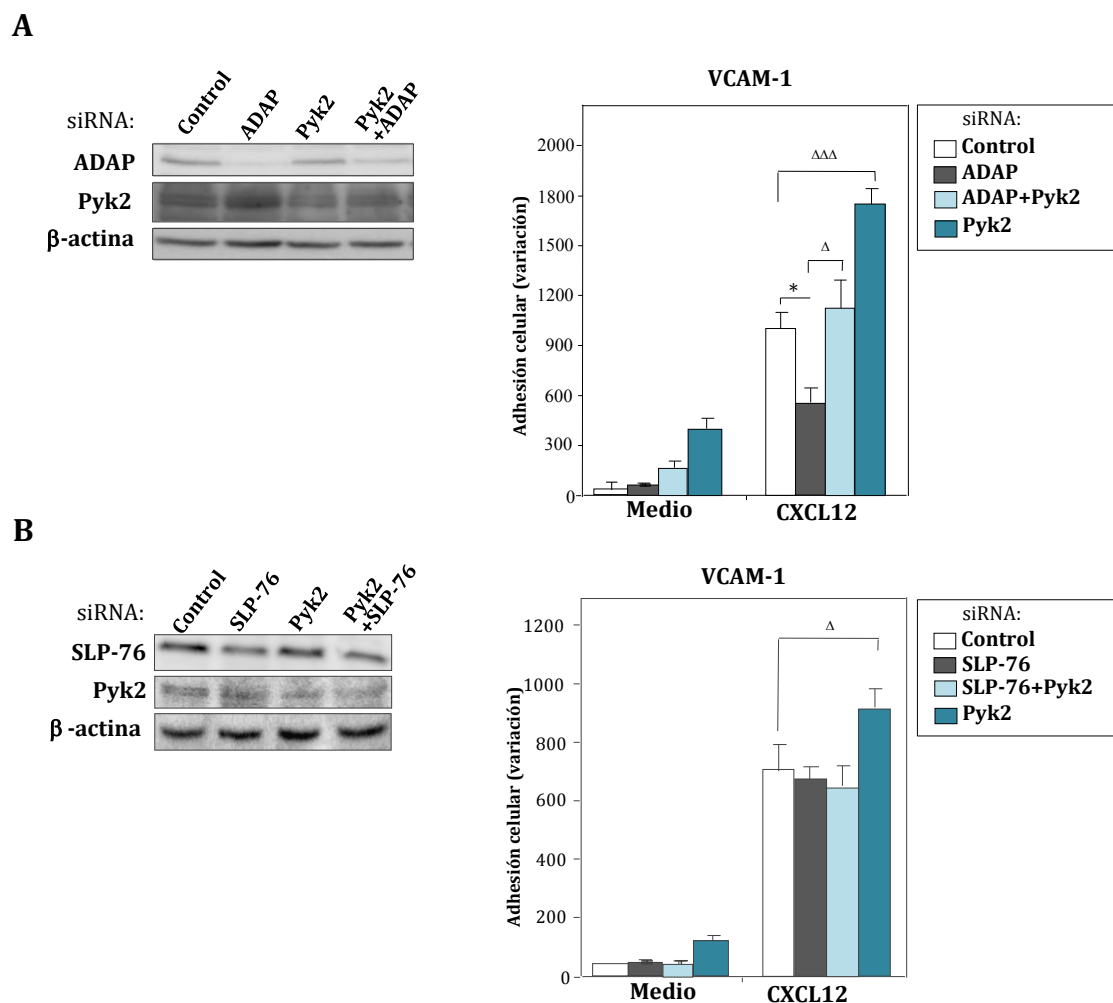


Figura 32. Análisis de las relaciones funcionales entre ADAP y Pyk2 en la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a CXCL12. (**A, B**) Las células Molt-4 fueron transfectadas con las combinaciones de siRNAs indicados, y los transfectantes analizados mediante *western blot* (**izquierda**) o en ensayos de adhesión estática a VCAM-1 coinmovilizado en ausencia o presencia de CXCL12 (**derecha**). Las adhesiones fueron significativamente inhibidas (* $p < 0.05$), o significativamente estimuladas o rescatadas (Δ $p < 0.05$, $\Delta\Delta$ $p < 0.001$, $\Delta\Delta\Delta$ $p < 0.0001$). (A, $n = 4$; B, $n = 3$).

Existen varias isoformas de Pyk2: una forma de 100 kDa expresada en células neuronales, plaquetas, células mastocíticas y células epiteliales³⁰⁸; una isoforma de 105 kDa, llamada Pyk-H, la cual tiene una delección entre dos secuencias ricas en prolinas, y que es expresada específicamente en células hematopoyéticas³⁰⁹; y una tercera isoforma, denominada PRNK (*Pyk2 related non-kinase*), expresada mayoritariamente en bazo y a la cual le faltan los dominios catalíticos y la región N-terminal³⁰⁹. De forma similar a la co-transfección de los

siRNA para ADAP y Pyk2, la sobreexpresión de PRNK junto al siRNA de ADAP llevó a la recuperación de la adhesión celular sobre VCAM-1/CXCL12 (**Figura 33A**).

Notablemente, el rescate de la adhesión mostrado por las células deplecionadas para ADAP y Pyk2 correlacionó con una activación de Rac1 sostenida en el tiempo comparado con la que presentan por los transfectantes control (**Figura 33B**). La pequeña disminución en la activación de Rac a tiempos cortos podría reflejar la inhibición inicial debida a la depleción de ADAP, la cual sería recuperada posteriormente por el silenciamiento de Pyk2. En conjunto, estos resultados sugieren que las actividades estimulatorias de ADAP e inhibitorias de Pyk2 durante la adhesión mediada por $\alpha 4\beta 1$ podrían estar conectadas a través de Rac1.

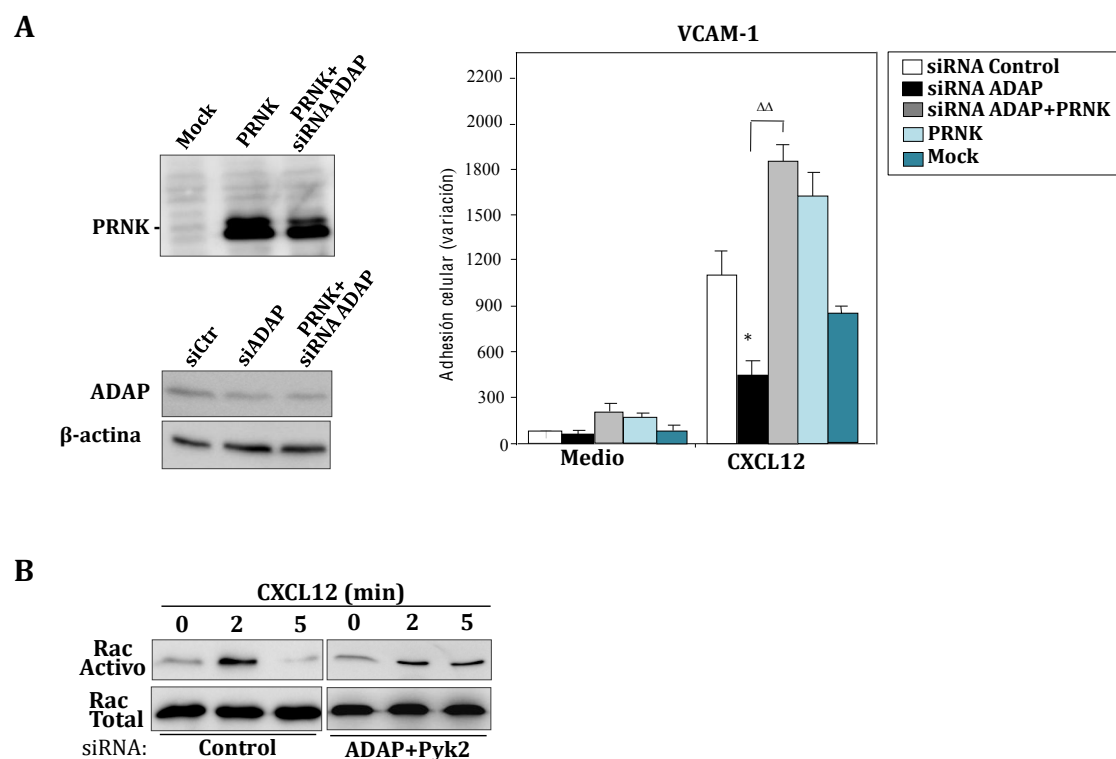


Figura 33. Efecto de la co-transfección del siRNA para ADAP y el vector PRNK en la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a CXCL12. **(A)** Las células Molt-4 fueron transfectadas con los siRNA y vectores indicados, y analizadas mediante western blot o en ensayos de adhesión sobre VCAM/CXCL12 (n=3). La adhesión fue significativamente inhibida (* p<0,05), o significativamente estimulada o rescatada ($\Delta\Delta$ p<0,01). **(B)** Las células Molt-4 fueron transfectadas con los siRNAs mostrados, y tras incubar con CXCL12 durante los tiempos indicados, fueron posteriormente analizadas en ensayos GTPasa para medir la activación de Rac. (n=3).

6. Papel de SKAP-1 en la estimulación por quimioquinas de la adhesión de linfocitos T mediada por $\alpha 4 \beta 1$

Tras haber caracterizado el papel estimulador de ADAP en la adhesión dependiente de $\alpha 4 \beta 1$ de células T en respuesta a quimioquinas, el siguiente objetivo fue el análisis de la posible participación en dicha adhesión de SKAP-1, el cual interacciona con ADAP^{267,283}. El análisis mediante co-inmunoprecipitación en células Molt-4 utilizando anticuerpos anti-SKAP-1 confirmó que SKAP-1 se asocia con ADAP así como con RIAM en condiciones basales (**Figura 34**). Notablemente, la incubación de estas células con CXCL12 se tradujo en una disociación transitoria de SKAP-1 con ADAP y RIAM.

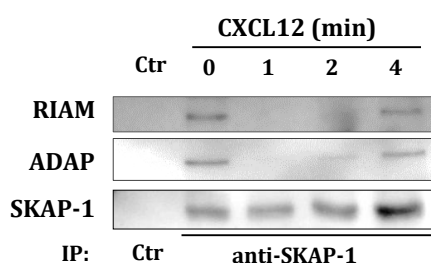


Figura 34. Análisis de la asociación de SKAP-1 con ADAP y RIAM. Las células Molt-4 fueron expuestas a CXCL12 durante los tiempos indicados y posteriormente sometidas a ensayos de inmunoprecipitación y *western blotting* utilizando los anticuerpos para las proteínas indicadas.

Resultados previos han mostrado que, mientras la ausencia de ADAP desestabiliza la expresión de SKAP-1^{275,277,278}, las células T deficientes en SKAP-1 mantienen la expresión de ADAP en niveles normales²⁷⁵. Asimismo, dichas células muestran niveles de expresión de las integrinas $\beta 1$ similares a los linfocitos T SKAP-1 +/+, aunque la ausencia de SKAP-1 se traduce en una disminución de su adhesión a fibronectina tras la activación del TCR²⁷⁵. Con el objetivo de estudiar el papel de SKAP-1 en la adhesión mediada por $\alpha 4 \beta 1$ en linfocitos T en respuesta a quimioquinas se usaron transfectantes de células Molt-4 que estaban silenciados o que sobreexpresaban SKAP-1, así como linfocitos T de ratones *knock out* para SKAP-1 (SKAP-1 -/-). Los experimentos de nucleofección usando RNAs de interferencia para SKAP-1 mostraron que el siRNA #1 era más eficaz que el siRNA #2 (**Figura 34A, izquierda**), por lo que se utilizó el primero para realizar los posteriores análisis funcionales. Además del siRNA #1, se utilizó también un *pool* de oligos de siRNA que deplecionaron SKAP-1 de una forma todavía más eficaz (*Smart pool*, Dharmacon) (**Figura 35A, derecha**). Se observó asimismo que las células silenciadas para SKAP-1 mostraban una expresión normal de ADAP

(Figura 35A, derecha). La depleción de SKAP-1 no afectó a la viabilidad celular (Figura 35B), lo cual fue determinado mediante marcaje con anexina y yoduro de propidio, y posterior citometría de flujo. Los experimentos de sobreexpresión de SKAP-1 fueron realizados mediante nucleofección con un plásmido pEGFP-SKAP-1 (Figura 35C). Los linfocitos T de bazo de ratones SKAP-1 +/+ y SKAP-1-/- fueron aislados tras disrupción mecánica y lisis de eritrocitos, siguiendo el protocolo anteriormente explicado en Materiales y Métodos. Los estudios con estos linfocitos fueron llevados a cabo durante la estancia predoctoral realizada en el laboratorio del Profesor Christopher E. Rudd, en la Universidad de Cambridge (Reino Unido).

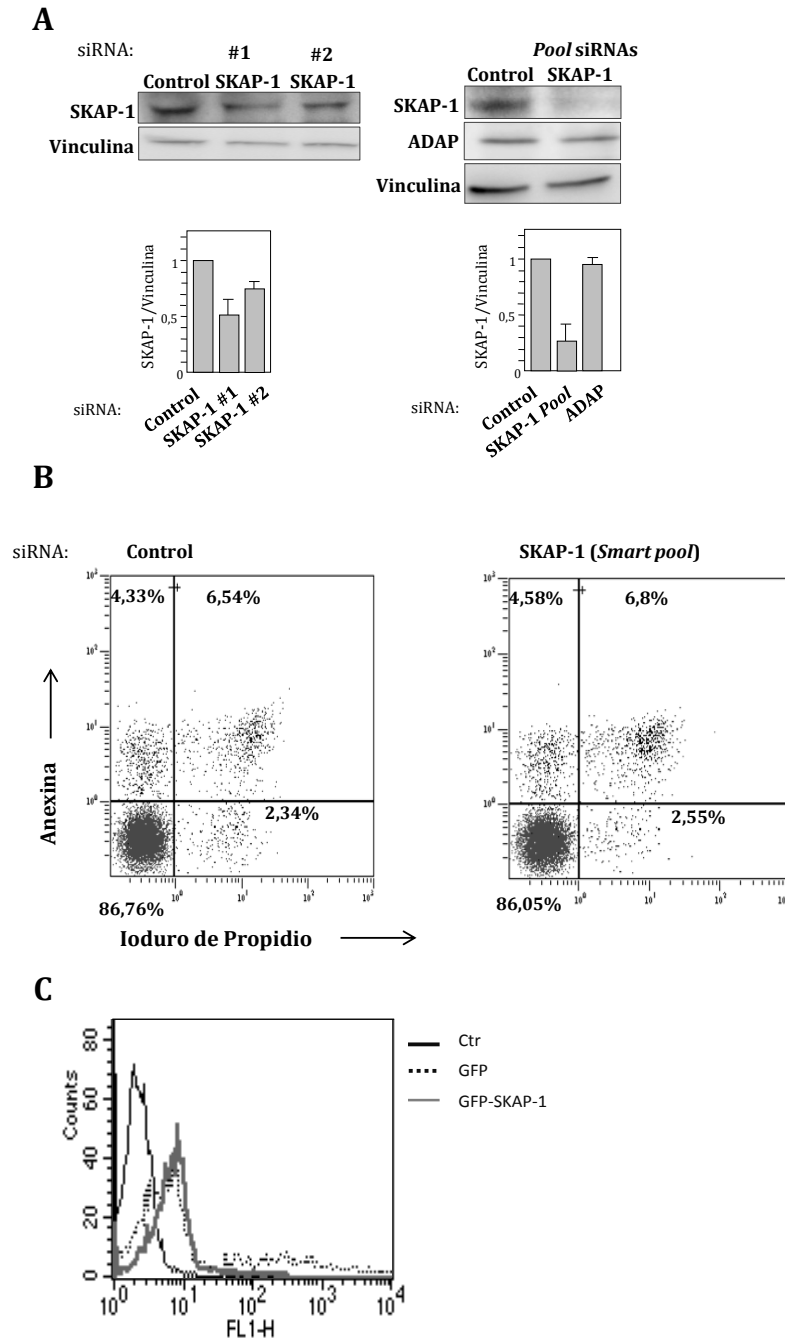
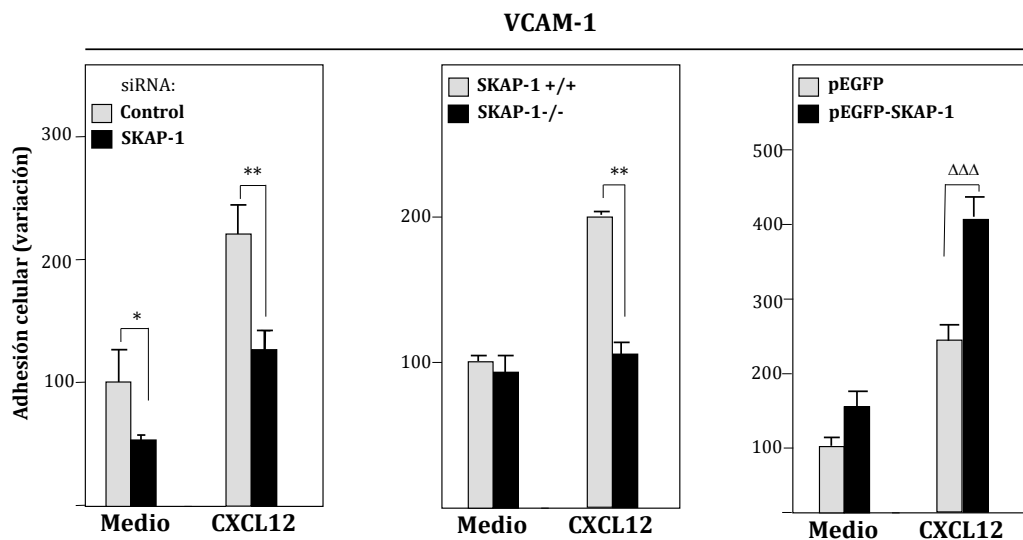


Figura 35. Silenciamiento y sobreexpresión de SKAP-1 en células Molt-4. **(A)** Análisis de la expresión de SKAP-1 y ADAP en células Molt-4 nucleofectadas con los siRNA indicados. Se muestra asimismo la cuantificación densitométrica de las bandas referidas a la carga analizada con anticuerpos anti-vinculina. **(B)** Análisis de la viabilidad celular de los distintos transfectantes en ensayos de citometría de flujo. **(C)** Las células Molt-4 fueron transfectadas con los vectores indicados y los transfectantes analizados mediante citometría de flujo. Se muestra asimismo el control de células no transfectadas (Ctr).

Experimentos de adhesión en condiciones estáticas a VCAM-1 y a FN-H89 co-inmovilizados en ausencia o presencia de CXCL12 mostraron que las células Molt-4 silenciadas para SKAP-1 exhibían una considerable reducción en dicha

adhesión a con respecto a las células transfectadas con siRNA control (**Figura 36A, B, izquierda**). De forma similar, los linfocitos T SKAP-1 $-/-$ mostraron una reducción significativa en su adhesión tanto a VCAM-1 como a FN-H89 (**Figura 36A, B, centro**). Por el contrario, la sobreexpresión de SKAP-1 en células Molt-4 se tradujo en un aumento de la adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$, especialmente cuando ligandos y quimioquina estaban co-inmovilizados (**Figura 36A, B derecha**). Estos datos indican que SKAP-1 juega un papel importante en la regulación de la adhesión linfocitaria mediada por $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a CXCL12.

A



B

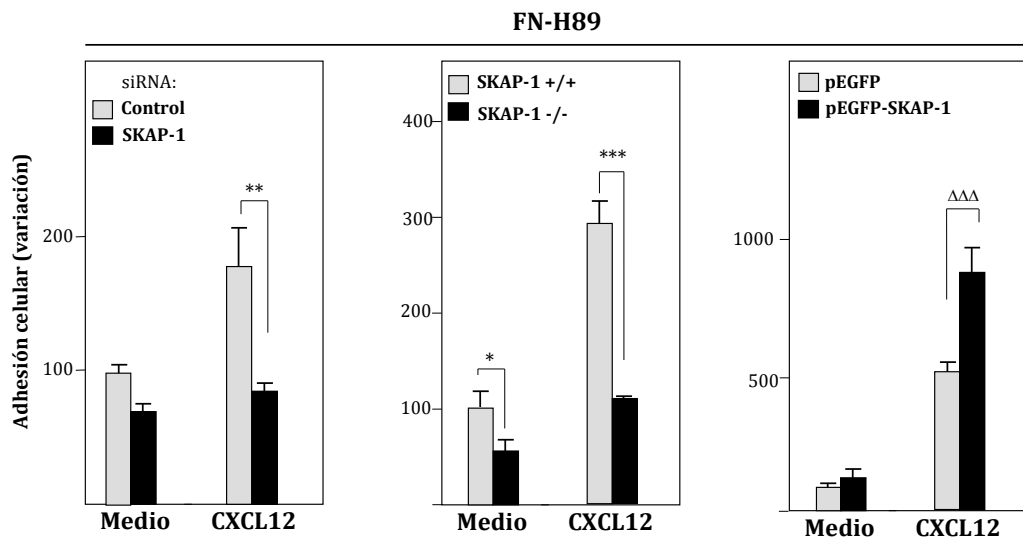


Figura 36. Papel de SKAP-1 en la estimulación por CXCL12 de la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4\beta 1$. Las células Molt-4 transfectadas con siRNA Control o SKAP-1 (**izquierda**), linfocitos de ratón T SKAP-1 $+/+$ o SKAP-1 $-/-$ (**centro**), y Molt-4 transfectadas con los vectores indicados (**derecha**) fueron utilizadas en ensayos de adhesión estática a VCAM-1 (**A**) y FN-H89 (**B**), en ausencia (Medio) o presencia de CXCL12 (izquierda y centro $n=4$; derecha $n=3$). (** $p<0,001$, ** $p<0,01$ o * $p<0,05$, $\Delta\Delta\Delta p<0,001$).

A continuación, utilizamos las células Molt-4 silenciadas para SKAP-1 en ensayos de migración hacia CXCL12 a través de una monocapa de células endoteliales incubadas con TNF- α para inducir la expresión de VCAM-1. Los resultados mostraron una reducción significativa en la migración de estas células a niveles similares a los obtenidos en la migración de células control en presencia de anticuerpos anti- $\alpha 4$ (**Figura 37A**).

En contraste con estos resultados, la ausencia de SKAP-1 en linfocitos T se tradujo en un aumento de la quimiotaxis hacia CXCL12 a través de superficies tapizadas con VCAM-1 en comparación con linfocitos T SKAP-1 +/+ (**Figura 37B**). Estos resultados confirman el importante papel de SKAP-1 en la adhesión mediada por $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a quimioquinas. El aumento en la migración de las células SKAP-1 -/- sobre VCAM-1 podría ser debido, en parte, a la interacción deficiente de dichas células con dicho ligando, lo que favorecería su migración hacia CXCL12. Asimismo, y como se mostrará a continuación, otra posible explicación sería que los linfocitos T SKAP-1 -/- tuvieran aumentada su capacidad migratoria sobre VCAM-1.

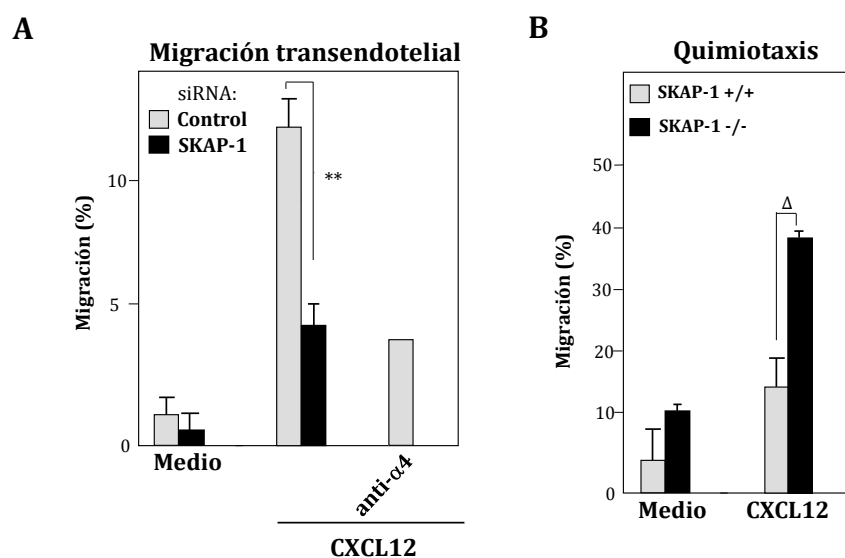


Figura 37. Papel de SKAP-1 en la migración de linfocitos T dependiente de $\alpha 4\beta 1$. (A) Las células Molt-4 transfectadas con siRNA control o con siRNA *smart pool* de SKAP-1, fueron sometidas a ensayos de migración transendotelial a través de células HUVEC expuestas a TNF- α . Se muestra asimismo la migración celular en presencia de anticuerpos anti- $\alpha 4$ (n=3; **p<0,01). (B) Los linfocitos SKAP-1 +/+ y SKAP-1 -/- se analizaron en ensayos de quimiotaxis hacia CXCL12 a través de transwells tapizados con VCAM-1 (n=3; Δ p<0,05).

Una prueba adicional de la implicación de SKAP-1 en la regulación de la adhesión de linfocitos T dependiente de $\alpha 4\beta 1$ procedió de análisis de la motilidad

de estas células mediante microscopía a tiempo real. En estos ensayos se evaluaron las dinámicas de movimiento de los linfocitos T sobre VCAM-1 en ausencia o presencia de CXCL12. Los datos indicaron que las células SKAP-1 $-/-$ presentaban una velocidad superior sobre dicho ligando que las células control SKAP-1 $+/+$ (0,15 $\mu\text{m/s}$ y 0,11 $\mu\text{m/s}$, respectivamente; $p < 0,001$) (**Figura 38A**). El análisis del desplazamiento en línea recta desde el punto inicial al punto final de las trayectorias recorridas mostró un aumento significativo de este parámetro en los linfocitos T SKAP-1 $-/-$ relativo al de los linfocitos *wild type* (131 μm y 65 μm , respectivamente; $p < 0,001$) (**Figura 38B**). Adicionalmente, dichos análisis mostraron asimismo un aumento en la variabilidad de la velocidad y los desplazamientos de las distintas trayectorias de los linfocitos SKAP-1 $-/-$ comparado con los linfocitos SKAP-1 $+/+$ en presencia de los diferentes estímulos. La presencia de CXCL12 junto con VCAM-1 aumentó ligeramente la velocidad migratoria tanto de linfocitos T SKAP-1 $+/+$ como SKAP-1 $-/-$, aunque no alcanzó el nivel de significación estadística (**Figura 38A**). No se observaron diferencias en el desplazamiento celular cuando la motilidad fue analizada sobre VCAM-1/ CXCL12 (**Figura 38B**).

Para cuantificar las diferencias observadas, medimos la dirección del desplazamiento de las células estimada como el índice de direccionabilidad (ID), definido como la relación entre la distancia neta dividida entre la distancia total recorrida. De este modo, un ID con valor 1 indicaría un desplazamiento totalmente lineal, mientras que los valores cercanos a 0 implicarían desplazamientos celulares alrededor del punto de origen. Los resultados mostraron que los linfocitos SKAP-1 $-/-$ exhibieron un significativo aumento del ID comparado con los linfocitos SKAP-1 $+/+$ (**Figura 38C**). En conjunto, estos datos junto con con la mayor quimiotaxis en presencia de VCAM-1 hacia CXCL12 que habíamos observado (**Figura 37B**) sugieren que la inhibición de la adhesión a VCAM-1 mostrada por los linfocitos T SKAP-1 $-/-$ les podría permitir una mayor velocidad y desplazamiento que los linfocitos SKAP-1 $+/+$.

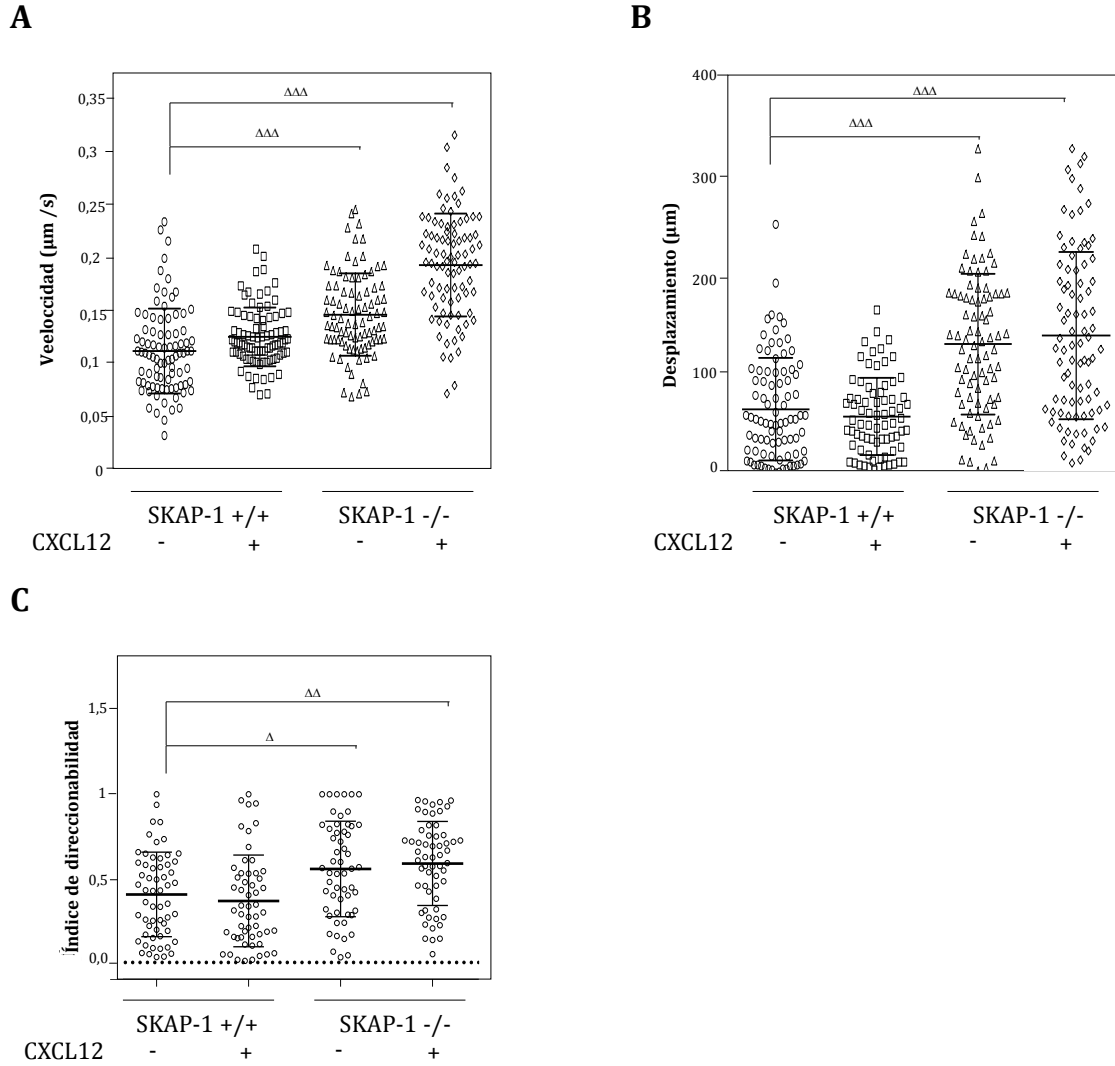


Figura 38. Análisis de la motilidad celular sobre VCAM-1/CXCL12 de linfocitos T SKAP-1 +/+ y SKAP-1 -/-. La motilidad celular de los linfocitos sobre superficies tapizadas con VCAM-1 en presencia o ausencia de CXCL12 fue analizada mediante microscopía en tiempo real. Se muestra la velocidad (**A**) y el desplazamiento en línea recta entre el punto inicial y el punto final (**B**) de los linfocitos T. El índice de direccionalidad se presenta en el panel **C** (n=3, Δ p<0,05, $\Delta\Delta$ p<0,01, $\Delta\Delta\Delta$ p<0,001).

Para profundizar todavía más en la implicación de SKAP-1 en la regulación de la adhesión celular dependiente de $\alpha 4\beta 1$, las células Molt-4 silenciadas para SKAP-1 o que sobreexpresaban esta proteína fueron sometidas a ensayos de adhesión en condiciones de flujo. Los resultados de estos análisis mostraron una disminución significativa en la adhesión estable de las células deplecionadas para SKAP-1, asociado a un aumento del *rolling* (**Figura 39A**). Por el contrario, los transfectantes que sobre-expresaban SKAP-1 mostraron un aumento en su adhesión estable y una disminución del *rolling* (**Figura 39A**).

Con el objetivo de analizar la fuerza de la adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$ de los distintos transfectantes en las cámaras de flujo, las células adheridas sobre VCAM-1/CXCL12 fueron sometidas a aumentos secuenciales del flujo desde 1 a 10 dinas/cm². Los transfectantes silenciados para SKAP-1 mostraron una reducción significativa de su resistencia al flujo, mientras los transfectantes que sobre-expresaban SKAP-1 exhibieron una resistencia al flujo ligeramente mayor que las células control transfectadas con el plásmido vacío pEGFP (**Figura 39B**).

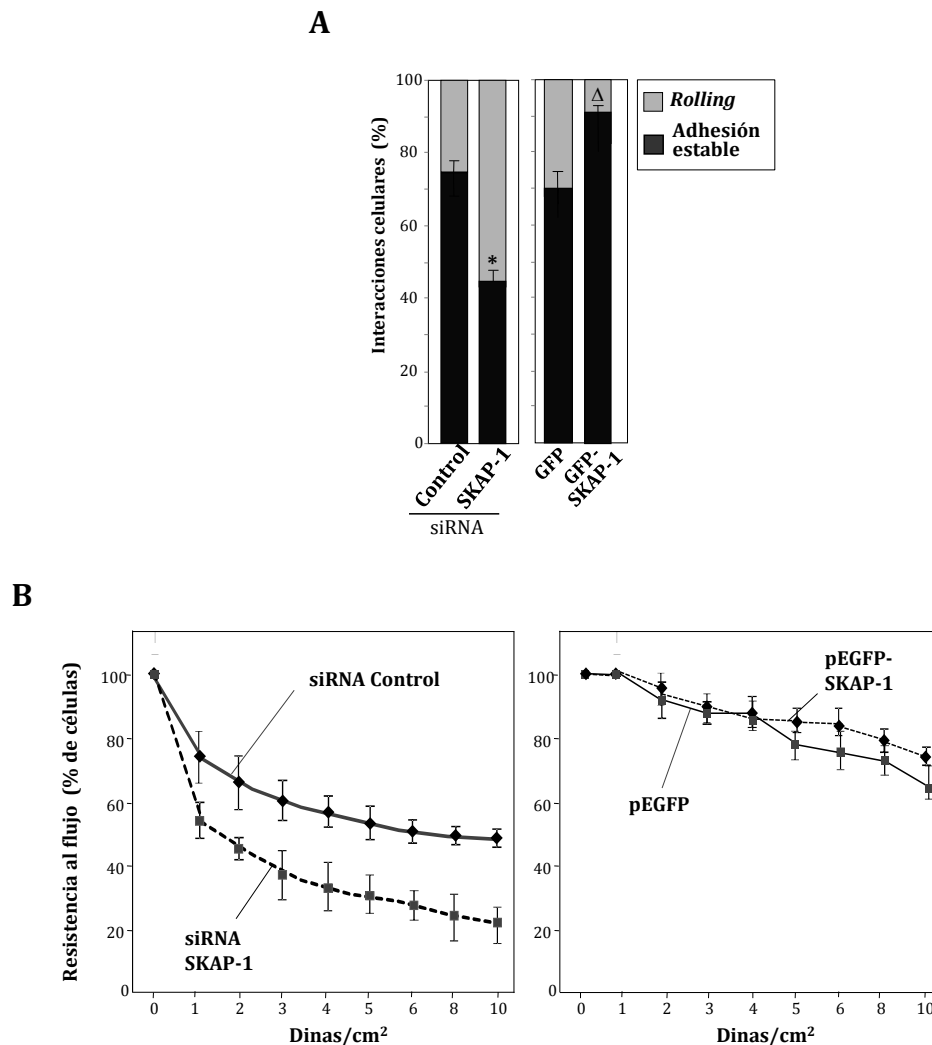


Figura 39. Papel de SKAP-1 en la adhesión de células T a VCAM-1/CXCL12 en condiciones de flujo. **(A)** Las células Molt-4 transfectadas con siRNA Control o un *pool* de siRNA de SKAP-1, así como con el plásmido pEGFP-SKAP-1 o su control pEGFP, fueron perfundidas en cámaras de flujo en presencia de VCAM-1 coinmovilizado con CXCL12. * $p < 0,05$; $\Delta p < 0,05$. **(B)** Las células adheridas fueron sometidas a aumentos progresivos de intensidad de flujo para determinar la resistencia de la adhesión celular. Los datos representan la media \pm SD del porcentaje de células que permanecieron adheridas en cada incremento de flujo, respecto del número inicial de células adheridas antes de aplicar el flujo. (n=3).

Todos estos datos confirman que SKAP-1 es requerida en la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4\beta 1$.

Finalmente, el análisis del *spreading* celular, la etapa posterior al reforzamiento de la adhesión, reveló que los linfocitos T SKAP-1 $-/-$ no presentan diferencias en su capacidad de *spreading* sobre VCAM-1/CXCL12 con respecto a los linfocitos T *wild type* (Figura 40), sugiriendo que SKAP-1 no tendría un papel relevante en dicho proceso.

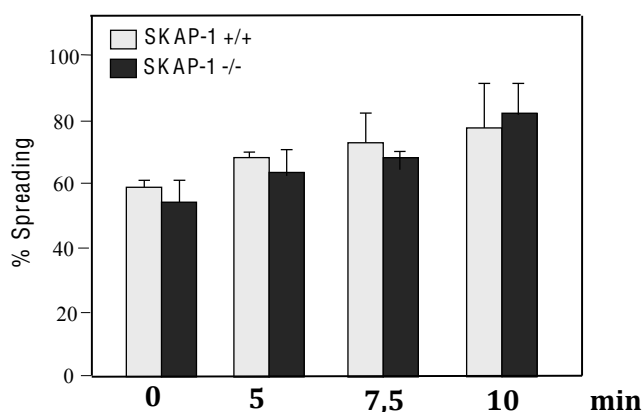


Figura 40. El *spreading* de linfocitos T es independiente de SKAP-1. Los linfocitos T SKAP-1 $+/+$ y SKAP-1 $-/-$ fueron sometidos a ensayos de *spreading* celular sobre VCAM-1/CXCL12 durante los tiempos indicados ($n=2$).

7. La generación de conformaciones de alta afinidad de $\alpha 4 \beta 1$ en respuesta a estimulación con CXCL12 es independiente de SKAP-1

La disminución en la adhesión de linfocitos T que carecen de SKAP-1 o están silenciados para esta proteína a VCAM-1 o FN-H89 podría deberse a una alteración en la adquisición de conformaciones de alta afinidad de $\alpha 4 \beta 1$. Para comprobar esta hipótesis se procedió a la incubación con CXCL12 de los transfectantes deplecionados para SKAP-1, los cuales fueron posteriormente incubados con el anticuerpo HUTS-21 y analizados a continuación mediante citometría de flujo. Los resultados indicaron que CXCL12 indujo un aumento similar de la unión de HUTS-21 a estos transfectantes en comparación con los transfectantes control (Figura 41A). Asimismo, ambos transfectantes mostraron valores parecidos de intensidad de fluorescencia cuando se expusieron a manganeso, usado como control positivo de la regulación de las integrinas $\beta 1$. Estos resultados indican que la adquisición de formas de alta afinidad de $\alpha 4 \beta 1$ después de la estimulación con quimioquinas no requiere la función de SKAP-1.

Adicionalmente, y tal y como se había previamente realizado con los transfectantes silenciados para SLP-76 y ADAP, se analizó la interacción directa de $\alpha 4 \beta 1$ con VCAM-1 tras la estimulación con quimioquinas de transfectantes deplecionados para SKAP-1. Dichos ensayos mostraron que VCAM-1-Fc

interaccionaba con estos transfectantes a niveles similares a los obtenidos con los transfectantes control (**Figura 41B**). Asimismo ambos transfectantes mostraron valores de unión a VCAM-1-Fc comparables en presencia de Manganeso. Estos datos sugieren que SKAP-1 no regula las etapas más iniciales de la interacción $\alpha 4\beta 1$ -VCAM-1 en respuesta a quimioquinas.

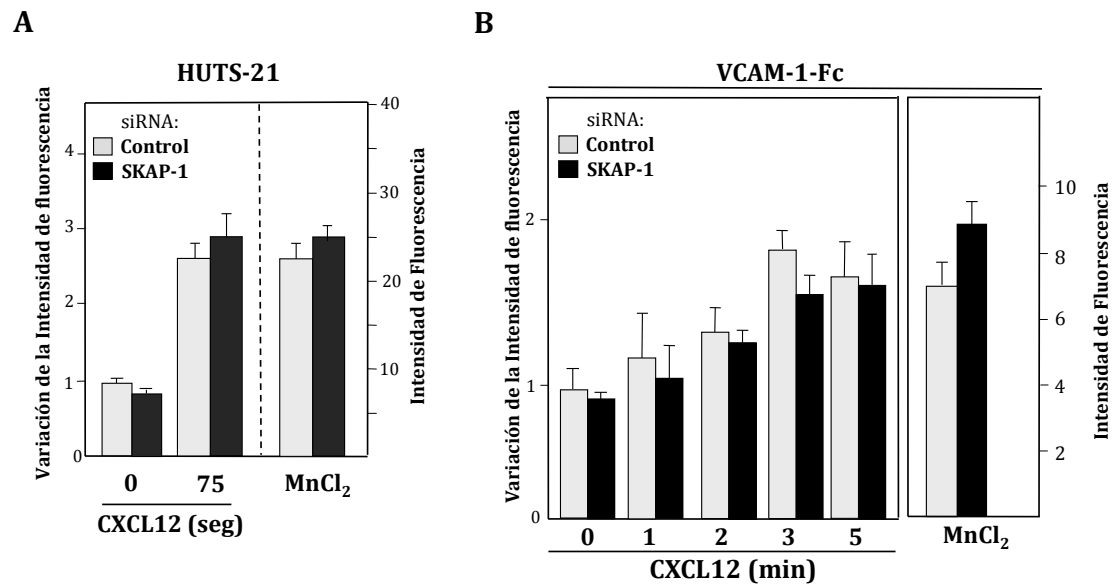


Figura 41. SKAP-1 no regula la afinidad de $\alpha 4\beta 1$. (A) Las células Molt-4 transfectadas con siRNA Control o SKAP-1 fueron incubadas en presencia o ausencia de CXCL12 o Mn^{2+} antes de incubarlas con el anticuerpo HUTS-21, cuya unión fue detectada por citometría de flujo. (B) Los mismos transfectantes fueron incubados en presencia o ausencia de CXCL12 o Mn^{2+} antes de añadir VCAM-1-Fc, el cual fue detectado asimismo por citometría de flujo.

8. SKAP-1 regula la activación de las GTPasas Rho

Como se ha mencionado anteriormente, Rac modular la etapa de reforzamiento de la adhesión de linfocitos T mediada por $\alpha 4\beta 1$ ¹⁸⁷. Dado que el silenciamiento de SKAP-1 se traduce en pérdida de la fuerza de adhesión a VCAM-1/CXCL12 en condiciones de flujo (**Figura 39**), analizamos el estado de la activación de Rac1 en linfocitos T procedentes de ratones SKAP-1 $-/-$. Dichas células mostraron una mayor activación basal de Rac1 y una activación mayor y más mantenida en respuesta a CXCL12 en comparación con linfocitos T SKAP-1 $+/+$ (**Figura 42A**).

Asimismo, en base al aumento observado en la motilidad celular en ausencia de SKAP-1, se estudió el papel de RhoA, dado que esta GTPasa controla la contractilidad de las fibras de actomiosina y promueve la migración celular.

Notablemente, los linfocitos T SKAP-1 $-/-$ mostraron niveles basales de activación de RhoA mayores que los linfocitos SKAP-1 $+/+$, los cuales aumentaron de forma transitoria en respuesta a CXCL12 (**Figura 42B**). La fosforilación de la cadena ligera de la miosina (MLC) constituye un evento *downstream* en la señalización de RhoA activado³¹⁰, por lo que analizamos sus niveles de fosforilación en linfocitos T SKAP-1 $-/-$ y SKAP $+/+$. Los resultados mostraron que MLC se encontraba más fosforilada en los linfocitos SKAP-1 $-/-$ en comparación con los linfocitos control en respuesta a CXCL12 (**Figura 42B**).

Dado que la migración celular depende de la activación de Rho GTPasas³¹¹, y habiendo observado la alteración en la activación de Rac y RhoA-MLC en los linfocitos T SKAP-1 $-/-$, realizamos ensayos de quimiotaxis hacia CXCL12 en ausencia de ligandos de $\alpha 4\beta 1$. Los resultados mostraron que estas células tienen menor capacidad quimiotáctica que los linfocitos T SKAP-1 $+/+$ (**Figura 42C**), indicando que la sobre-activación de RhoA y Rac1 en las células que carecen de SKAP-1 correlaciona con una inhibición de migración celular. Colectivamente, todos estos resultados indican que la estimulación por CXCL12 de la adhesión dependiente de linfocitos T mediada por $\alpha 4\beta 1$ requiere la actividad de SKAP-1. Asimismo, estos datos sugieren que SKAP-1 regula negativamente la activación de Rac y RhoA.

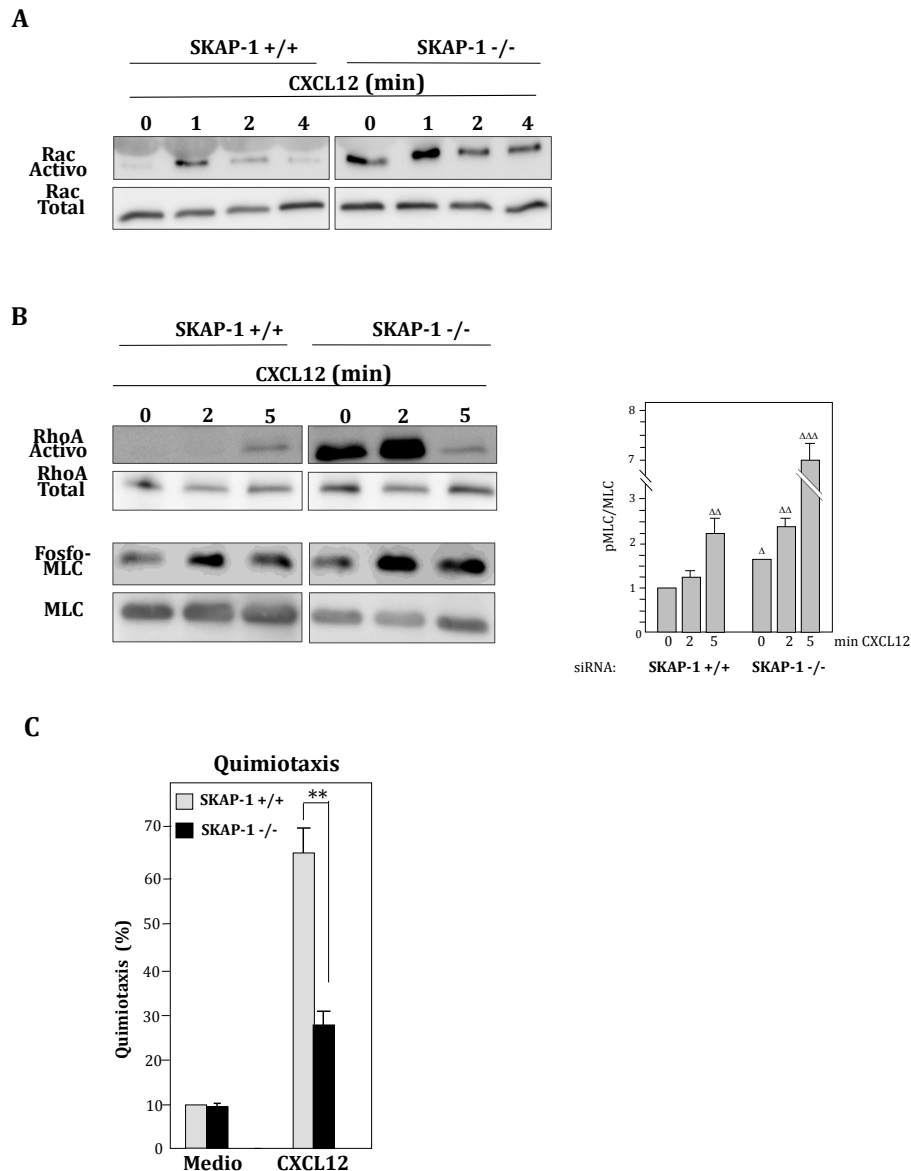


Figura 42. SKAP-1 regula la activación de Rac1 y RhoA-MLC en linfocitos T. Los linfocitos T SKAP-1 +/+ y SKAP-1 -/- fueron expuestos a CXCL12 (200 ng/ml) durante los tiempos indicados y posteriormente lisados. Los extractos fueron analizados mediante ensayos GTPasa para medir la activación de Rac (**A**) y de RhoA (**B**). Asimismo se analizó la fosforilación de la cadena ligera de la miosina (MLC) después de la estimulación con CXCL12. Se muestra la cuantificación densitométrica de las bandas referidas a la carga (**C**). Los linfocitos SKAP-1 +/+ y SKAP-1 -/- se analizaron en ensayos de quimiotaxis hacia CXCL12 (A, n=2; B, n=3; C, n=3; ^Δ p<0.05, ^{ΔΔ} p<0.01, ^{ΔΔΔ} p<0.001, ^{**} p<0.01).

2. Papel de ICAP-1 en el proceso de adhesión mediado por $\alpha 4 \beta 1$

La activación de las integrinas está estrechamente regulada por la señalización *inside-out* inducida por las interacciones de las quimioquinas con sus receptores, y que tiene su punto final en la unión de distintas moléculas intracelulares con el dominio citoplasmático de las subunidades β de las integrinas²⁷. La talina y las proteínas kindlin interaccionan con dichos dominios y activan a las integrinas, pero poco se sabe del papel que juegan proteínas que se unen asimismo a estos dominios y que potencialmente inactivan las integrinas, como el caso de ICAP-1. Así, se ha observado que en células epiteliales⁴⁷ y en osteoclastos^{85,86}, ICAP-1 se une al dominio citoplasmático de $\beta 1$ compitiendo posiblemente con kindlin-3 y solapando con el dominio de unión de talina a la integrina. Basándonos en estas observaciones, el objetivo de este estudio consistió en dilucidar si la adhesión mediada por la integrina $\alpha 4 \beta 1$ a sus ligandos estaba afectada en linfocitos T que carecen de ICAP-1.

1. Papel de ICAP-1 en la adhesión de linfocitos T dependiente de $\alpha 4 \beta 1$

Experimentos de co-inmunoprecipitación en células Molt-4 utilizando anticuerpos anti- $\beta 1$ mostraron que en condiciones basales tanto talina como kindlin-3 e ICAP-1 co-precipitaban con la subunidad $\beta 1$ (**Figura 43**). Tras la incubación con CXCL12 se produjo el aumento de la asociación talina/ $\beta 1$ ya documentada¹⁸⁸, y pudimos observar que kindlin-3 incrementaba asimismo su asociación con dicho complejo. La interacción de ICAP-1 con $\beta 1$ fue estimulada asimismo por CXCL12 pero con dinámicas más lentas que las observadas en las asociaciones de $\beta 1$ con talina y kindlin-3. No se han encontrado claras evidencias de que el incremento de la asociación entre $\beta 1$ e ICAP-1 ocurra en paralelo con la disociación de $\beta 1$ con talina y kindlin-3.

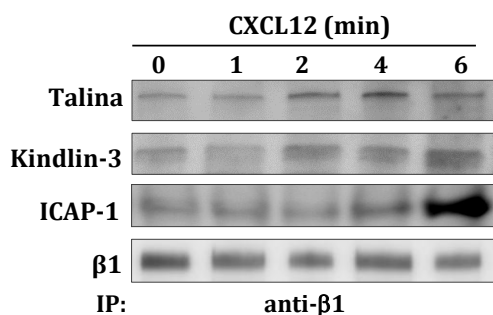


Figura 43. Análisis de la asociación de ICAP-1 con $\beta 1$. Las células Molt-4 fueron expuestas a CXCL12 durante los tiempos indicados y posteriormente sometidas a ensayos de inmunoprecipitación y *western blotting* utilizando los anticuerpos para las proteínas indicadas.

Tras observar que ICAP-1 se une a $\beta 1$ en linfocitos T, estudiamos su papel en la adhesión linfocitaria mediada por $\alpha 4\beta 1$. Para ello, se usaron linfocitos T primarios de ratones *wt* y *ko* para ICAP-1, así como transfectantes silenciados para esta proteína. Debido a la baja fertilidad de los ratones ICAP-1 *-/-* utilizados, éstos se obtuvieron mediante el cruce de ratones heterocigotos ICAP *+/-*. Los animales se genotiparon por PCR, resolviéndose sus productos en geles de agarosa. Los ratones ICAP-1 *+/+* mostraron un fragmento de DNA de 217 pb, los ratones ICAP-1 *+/-* presentaron una banda de 217 pb y otra de 309 pb, mientras que los ICAP-1 *-/-* mostraban un fragmento de 309 pb (**Figura 44A**). Se comprobó a su vez la expresión de ICAP-1 y talina mediante *western blot* de lisados de bazo, mostrándose una disminución en su expresión en ratones ICAP-1 *+/-* con respecto a ICAP-1 *+/+*, y la nula expresión de dicha proteína en lisados de ratones ICAP-1 *-/-* (**Figura 44B**). Aunque la cantidad total de talina en los tres lisados era semejante, nuestros resultados preliminares apuntan a que el procesamiento de talina podría estar alterado en los esplenocitos de ratones ICAP-1 *-/-*. Este punto será objeto de futuros estudios.

Trabajos previos habían mostrado que la sobreexpresión de ICAP-1 en osteoblastos provocaba un aumento de su proliferación⁹⁷, por lo que se quiso conocer si la capacidad proliferativa de los linfocitos T primarios ICAP-1 *-/-* estaba asimismo alterada. Utilizando el mismo protocolo de purificación de linfocitos T anteriormente mencionado para ratones SKAP-1 *knock-out*, tras la incubación durante 3 días con anti-CD3 se analizó su proliferación utilizando el reactivo CCK-8. Los resultados mostraron una ligera pero significativa disminución de la proliferación en los linfocitos ICAP-1 *-/-* en comparación con los linfocitos *wt* (**Figura 44C**).

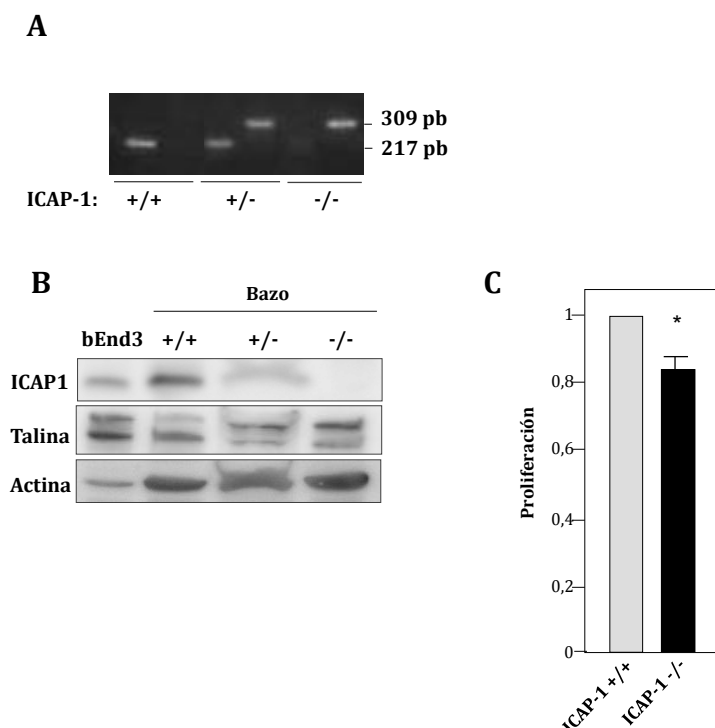


Figura 44. Genotipado y caracterización de ratones *knock out* para ICAP-1. **(A)** El DNA genómico extraído de las colas de los ratones fue genotipado resolviéndose en geles de agarosa. **(B)** Los lisados del bazo de los ratones fueron analizados mediante *western blot* con el fin de evaluar la expresión de ICAP-1 y talina. Se muestra asimismo la expresión de estas proteínas en células bEnd3 utilizadas como control positivo de expresión de ICAP-1. **(C)** Los linfocitos T aislados de ratones ICAP-1 +/+ y ICAP-1 -/- fueron sometidos a ensayos de proliferación en presencia de anti-CD3 (2 μ g/ml) (* $p < 0,05$).

El silenciamiento de ICAP-1 en células Molt-4 se hizo mediante nucleofección usando siRNA de interferencia. Debido a que los anticuerpos comerciales anti-ICAP-1 requieren cantidades elevadas de ICAP-1 para su detección mediante *western blotting*, la comprobación del silenciamiento se realizó por qPCR. Se observó que el siRNA #2 producía una disminución del 40% en la expresión de ICAP-1, mientras que el siRNA #1 no tenía efecto (**Figura 45A**), por lo que se utilizó el primero en los ensayos. Asimismo, observamos que la bajada de la expresión de ICAP-1 no afectaba significativamente la supervivencia celular (**Figura 45B**).

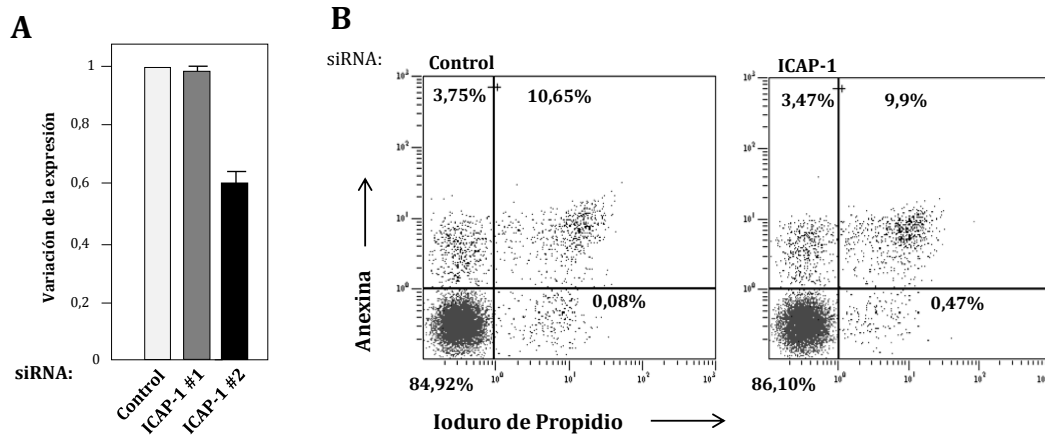


Figura 45. Silenciamiento de ICAP-1 en células Molt-4. (A) Las células Molt-4 fueron transfectadas con siRNA Control o ICAP-1, y su expresión fue analizada por qPCR. (B) Los transfectantes fueron analizados en ensayos de viabilidad celular.

Para determinar si la ausencia de ICAP-1 afectaba a la adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$ se sometieron los transfectantes silenciados para ICAP-1 y los linfocitos T de ratones ICAP-1 $-/-$, así como sus correspondientes controles, a experimentos de adhesión en condiciones estáticas, en ausencia o presencia de CXCL12. Los resultados indicaron que tanto las células Molt-4 silenciadas para ICAP-1 como los linfocitos T primarios ICAP-1 $-/-$ exhibían un aumento significativo de la adhesión sobre VCAM-1 en comparación con las células control (Figura 46). Estos resultados sugieren que ICAP-1 poseería un papel represor de la adhesión de linfocitos T mediada por $\alpha 4\beta 1$.

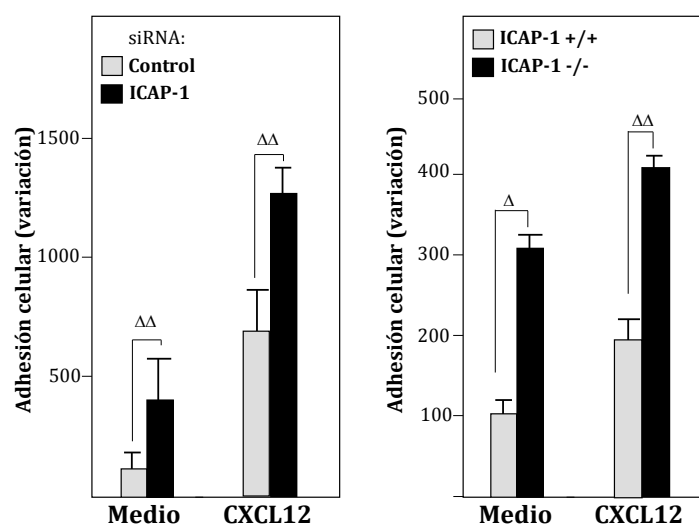


Figura 46. Papel de ICAP-1 en la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4\beta 1$. Las células Molt-4 silenciadas para ICAP-1 (izquierda), y linfocitos T ICAP-1 $+/+$ y ICAP-1 $-/-$ (derecha), fueron utilizadas en ensayos de adhesión estática a VCAM-1 en ausencia (Medio) o presencia de CXCL12 (200 ng/ml) ($^{\Delta}$ $p < 0,05$, $^{\Delta\Delta}$ $p < 0,01$).

Con el objetivo de identificar las etapas de la adhesión celular que estaban alteradas en los linfocitos ICAP-1 $-/-$, llevamos a cabo ensayos de adhesión en condiciones de flujo. Para ello se perfundieron esplenocitos de ratones ICAP-1 $+/+$, ICAP-1 $+/-$ y ICAP-1 $-/-$ en cámaras de flujo que contenían VCAM-1 co-inmovilizado con CXCL12, a una velocidad inicial de 1 dina/cm², analizándose los niveles de adhesión estable y de *rolling*. La ausencia de ICAP-1 se tradujo en un aumento del número de células adheridas de forma estable, así como haciendo *rolling*, en comparación con esplenocitos ICAP-1 $+/+$ e ICAP-1 $-/-$ (**Figura 47A, izquierda**). Sin embargo, el porcentaje de células en cada tipo de adhesión referido al número total de célula adheridas no sufrió variaciones entre los tres tipos celulares (**Figura 47A, derecha**).

A continuación se analizó la fuerza de la adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$, sometiendo a las células adheridas a VCAM-1/CXCL12 a aumentos secuenciales del flujo hasta 10 dinas/cm². Aunque el número de células adheridas inicialmente reflejaba el aumento de adhesión de los linfocitos ICAP-1 $-/-$ e ICAP-1 $+/-$ con respecto a los linfocitos ICAP-1 $+/+$, los perfiles de pérdida de la adhesión al incrementar el flujo mostraron pendientes similares entre los tres tipos celulares (**Figura 47B**). Asimismo, análisis del *spreading* celular que sigue a la etapa de reforzamiento de adhesión indicó que los linfocitos T ICAP-1 $-/-$ no mostraban diferencias significativas en su *spreading* sobre VCAM-1/CXCL12 con respecto a los linfocitos T ICAP-1 $+/+$ (**Figura 47C**). Estos datos sugerirían que ICAP-1 regula la adhesión linfocitaria dependiente de $\alpha 4\beta 1$ principalmente en las primeras etapas de la adhesión, mientras que el reforzamiento de la adhesión y el *spreading* posterior serían independientes de ICAP-1.

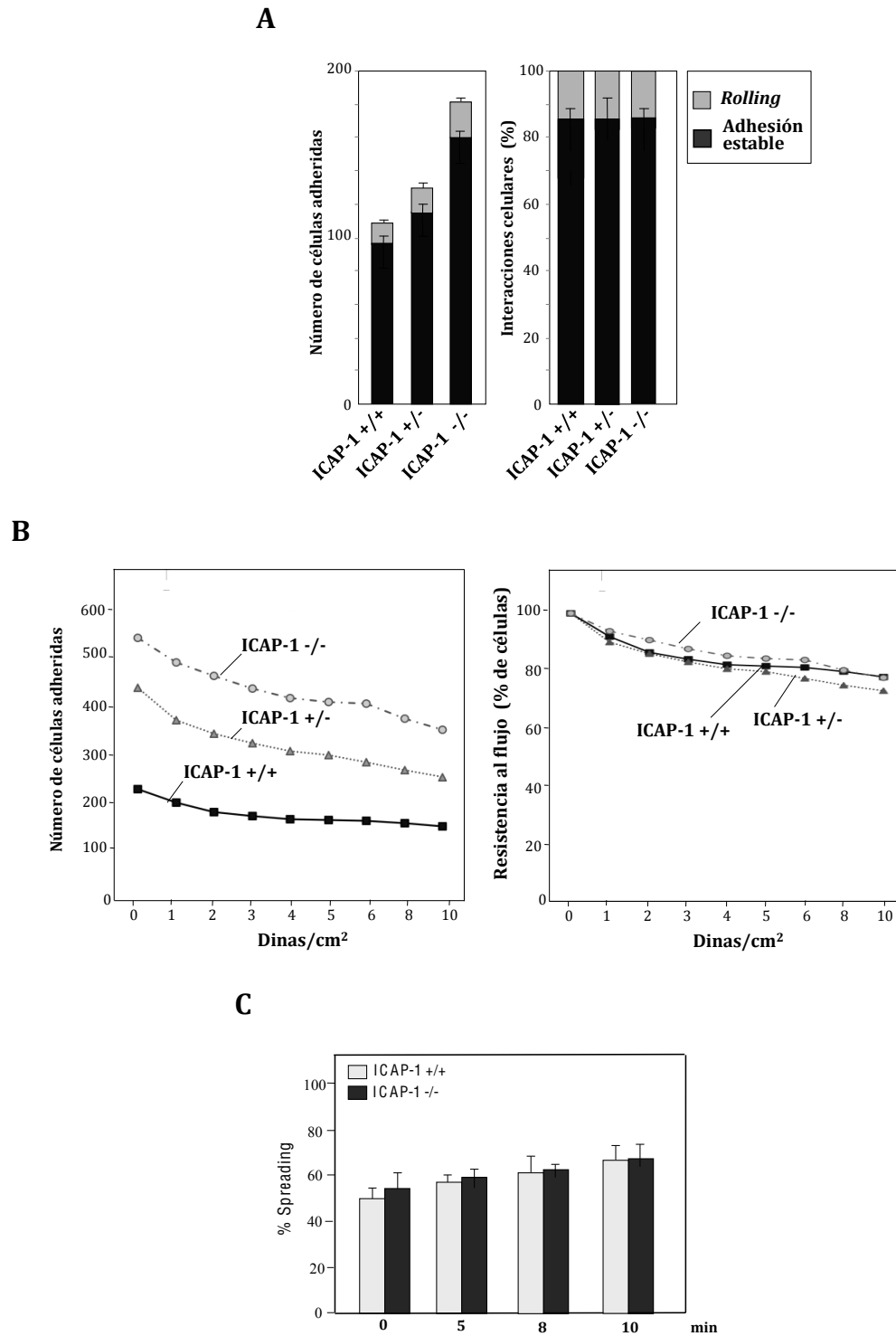
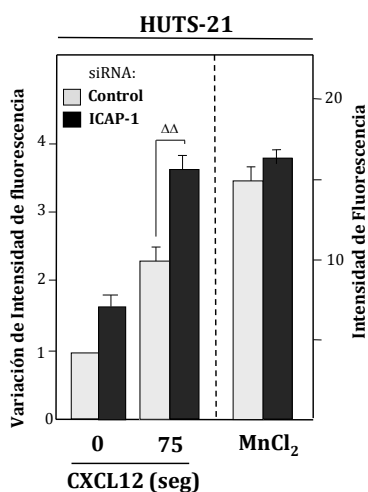


Figura 47. Papel de ICAP-1 en la adhesión de linfocitos a VCAM-1 en condiciones de flujo. (A) Esplenocitos ICAP-1 $+/+$, ICAP-1 $+/-$ y ICAP-1 $-/-$ fueron sometidos a ensayos de adhesión en cámaras de flujo en presencia de VCAM-1 co-inmovilizado con CXCL12 ($n=2$). **(B)** Las células adheridas se expusieron posteriormente a incrementos progresivos de la intensidad de flujo para determinar la resistencia de la adhesión celular. **(C)** Los esplenocitos de ratón fueron sometidos asimismo a ensayos de *spreading* celular sobre VCAM-1/CXCL12 ($n=2$).

2. ICAP-1 regula negativamente afinidad de $\alpha 4 \beta 1$ estimulada por quimioquinas

Para evaluar si la generación de conformaciones de alta afinidad de $\alpha 4 \beta 1$ tras la estimulación con CXCL12 que tiene lugar en las primeras etapas de la adhesión estaba alterada en ausencia de ICAP-1, se hicieron ensayos de citometría de flujo con el anticuerpo HUTS-21. Las células Molt-4 silenciadas para ICAP-1 mostraron niveles de unión a HUTS-21 mayor tras la estimulación con CXCL12 que los transfectantes control (**Figura 48**), indicado que ICAP-1 regula negativamente la afinidad de $\alpha 4 \beta 1$.



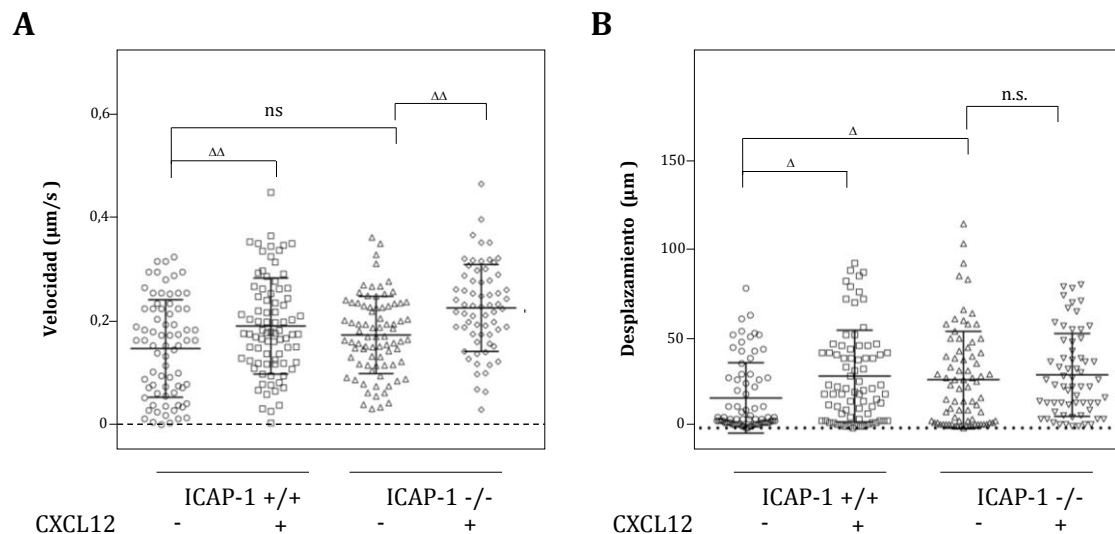


Figura 49. Análisis de la motilidad celular sobre VCAM-1/CXCL12 de linfocitos T ICAP-1 +/+ y ICAP-1 -/-. Los linfocitos T fueron sometidos a ensayos de microscopía en tiempo real sobre superficies tapizadas con VCAM-1 en presencia o ausencia de CXCL12 (n=3, Δ p<0,05, $\Delta\Delta$ p<0,01.).

3. La ausencia de ICAP-1 no modifica las proporciones en las poblaciones celulares en sangre periférica

Con el objetivo futuro de estudiar si ICAP-1 está implicada en el desarrollo y tráfico de células del sistema inmunitario, hemos realizado un primer análisis del contenido de diferentes tipos celulares en sangre periférica de ratones ICAP-1 -/- en comparación con ICAP-1 +/+. Los análisis de sangre de dichos ratones han revelado la ausencia de diferencias estadísticamente significativas en los parámetros estudiados (**Tabla 9**).

Prueba	Unidades	ICAP-1 +/+	ICAP-1 -/-
Leucocitos	$10^3/\text{mm}^3$	2,88±1,53	3,34±0,72
Eritrocitos	$10^6/\text{mm}^3$	8,12±0,99	7,96±0,64
Hemoglobina	g/dl	12,45±1,04	12,4±1,03
Hematocrito	%	40,2±3,82	39,77±3,54
Volumen Corpuscular	μm^3	49,75±1,83	50,14±2,40
Volumen Corpuscular Hemoglobina	pg	15,40±0,89	15,61±0,64
Concentración Hemoglobina	g/dl	31,00±0,78	31,20±0,93
Amplitud de Distribución Eritrocitaria	%	11,05±1,31	11,31±1,09
Conteo de Plaquetas	$10^3/\text{mm}^3$	850,25±154,04	828,00±237,79
Volumen Plaquetario	μm^3	6,06±0,24	6,00±0,88
Neutrófilos	%	17,15±4,01	25,63±12,92
Linfocitos	%	70,25±13,64	68,13±11,81
Eosinófilos	%	2,45±0,09	2,08±0,67
Basófilos	%	0,11±0,09	0,1±0,06
Neutrófilos	$10^3/\text{mm}^3$	0,45±0,13	0,41±0,20
Linfocitos	$10^3/\text{mm}^3$	1,71±0,93	1,67±0,70
Monocitos	$10^3/\text{mm}^3$	0,09±0,08	0,09±0,04
Eosinófilos	$10^3/\text{mm}^3$	0,08±0,04	0,04±0,02
Basófilos	$10^3/\text{mm}^3$	0,005±0,009	0,004±0,009

Tabla 9. Analítica de sangre periférica de ratones ICAP-1 +/+ y ICAP-1 -/-. (n=6-8).

3.Dinámicas de difusión y movilidad lateral de la integrina $\beta 1$

La observación de las dinámicas biomoleculares en tiempo real despierta muchas preguntas en biología celular: cómo las moléculas translocan, qué interacciones se producen entre ellas o cuál es la respuesta al ambiente. La posibilidad de detectar una sola molécula con suficiente sensibilidad hizo posible localizar moléculas individuales fluorescentes con precisión nanométrica^{312,313}.

En los años 80, se introdujo el concepto de *Single Particle Tracking* (SPT). La técnica SPT utiliza microscopía en tiempo real para monitorizar las dinámicas de las moléculas individuales con gran precisión y especificidad^{314,315}, permitiendo el seguimiento de las biomoléculas con una alta resolución temporal (ratios de *frame* de hasta 40kHz), y una excelente exactitud en su localización espacial (1-10 nm). Así, las mejoras en SPT permitieron la detección y el seguimiento en células vivas de lípidos, proteínas asociadas a membrana y proteínas motoras citosólicas³¹².

La principal desventaja del SPT está relacionada con las sondas usadas, principalmente debido a su tamaño relativamente grande. La unión entre las biomoléculas y las sondas específicas puede causar artefactos, como el hecho de activar procesos celulares o provocar el entorpecimiento de la difusión biomolecular en las membranas biológicas. La elección de la sonda ha de hacerse teniendo en cuenta su estabilidad, especificidad, tamaño y conjugación. Los fluoróforos individuales, los Quantum Dots o las partículas de oro o poliestireno han sido usadas para caracterizar la difusión de los receptores individuales y los lípidos en la membrana celular^{316,317}. En el presente estudio, los Quantum Dots (QDots) fueron las sondas escogidas para conjugarse con los anticuerpos α - β 1, debido a su estabilidad en soluciones acuosas y en un amplio rango de pH. Los QDots contienen un núcleo (ej. Cd y Se) rodeado de una coraza semiconductora de ZnS que mejora las propiedades ópticas³¹⁸.

El objetivo de este apartado ha consistido en analizar la difusión de la integrina α 4 β 1 en respuesta a la quimioquina CXCL12. La conformación molecular y la difusión lateral de las integrinas en membrana están estrechamente relacionadas, por lo que es necesario conocer el papel de la movilidad de dichas moléculas en los eventos adhesivos.

1. La movilidad de las integrinas $\beta 1$ en células T disminuye en presencia de CXCL12

La difusión de las integrinas $\beta 1$ fue estudiada en células Molt-4 incubadas en presencia de CXCL12. Dichas células se dejaron sedimentar sobre el fondo de cristales tapizados con poli-L-lisina, y fueron marcadas con el anticuerpo 18 mAb, el cual reconoce todas las moléculas de las integrinas $\beta 1$ independientemente de su estado de activación, y que había sido previamente conjugado con los Quantum Dots. El máximo tiempo de exposición de las células en presencia de los conjugados anticuerpos-Qdots fue de 20 min, debido al aumento de la posibilidad de internalización de los complejos integrina-anticuerpo-QDots.

Debido a que la acción de las quimioquinas sobre las células es transitoria, el análisis de las trayectorias moleculares después de la estimulación con CXCL12 se hizo dividiendo el tiempo de exposición a ésta en dos: de 0-5 y de 5-10 min. Las imágenes fueron tomadas enfocando la zona central de la membrana celular superior, evitando las zonas de la periferia, debido a la posibilidad de que los QDots desaparecieran del plano focal (**Figura 50**). Para minimizar los artefactos asociados con la proximidad de la membrana celular al sustrato del cristal se usó microscopía TIRF (*Total Internal Reflection Fluorescence*), la cual utiliza un haz de luz oblicuo.

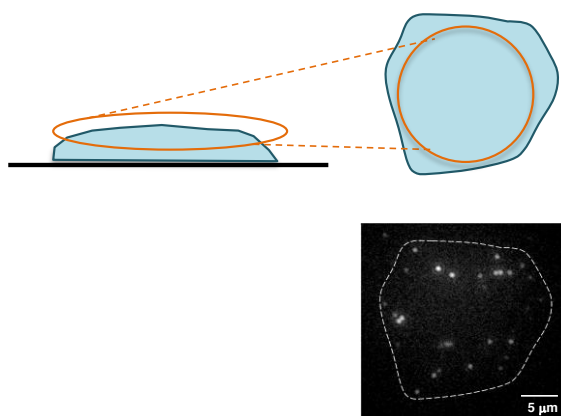


Figura 50. Modelo de adquisición de las imágenes mediante microscopía TIRF, e imagen representativa de la localización de las moléculas $\beta 1$ marcadas con QDots en la parte superior de las células Molt-4.

En primer lugar, las trayectorias en dos dimensiones en el plano focal (2000 trayectorias en cada condición) fueron reconstruidas basadas en un algoritmo de MatLab, como se ha explicado en Materiales y Métodos. Brevemente, para cada trayectoria se realizó un ajuste lineal del desplazamiento cuadrático medio (*Mean Square Displacement* o MSD) en función del tiempo, con el fin de obtener para cada

una de ellas un **coeficiente de difusión D para periodos cortos de tiempo**. El cálculo de la MSD permite clasificar la movilidad o difusión molecular. Si un objeto exhibe difusión al azar, la curva MSD se adecua a una función lineal. Los diferentes tipos de desviaciones con respecto a la difusión normal, se clasifican como difusión anómala subdifusiva (confinada y fija) y superdifusiva (o dirigida), y se caracterizan por una desviación de la relación linear (**Figura 51**). Dichas desviaciones son causadas por interacciones entre las biomoléculas³¹⁵.

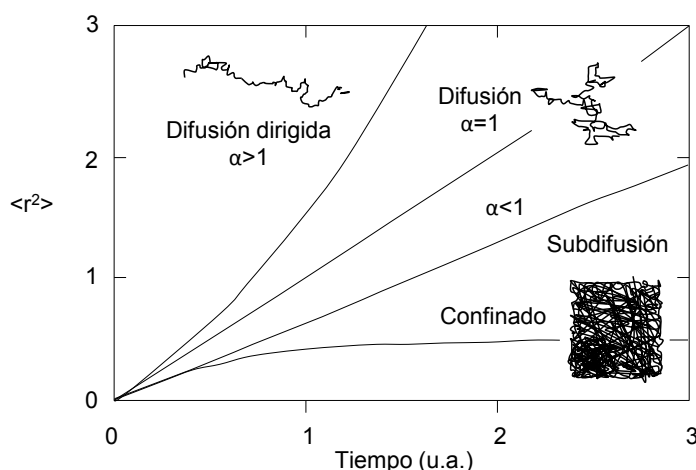


Figura 51. Formas analíticas de los diferentes tipos de difusión. Se muestra la difusión dirigida, la recta representa la difusión al azar, la siguiente curva representa la difusión anómala y la última curva representa la difusión confinada. Se muestran asimismo ejemplos de dibujos de las trayectorias. Se representa $\langle r^2 \rangle$ (desplazamiento cuadrático medio o MSD) frente al tiempo.

El coeficiente de difusión D de las integrinas $\beta 1$ fue calculado de forma individualizada para cada célula. Comparado con el coeficiente de difusión de las integrinas $\beta 1$ en ausencia de estímulo (Medio), éste se vio reducido significativamente al estimular las células con CXCL12 (**Figura 52**). Asimismo, pudimos observar que la variabilidad de la difusión de las integrinas $\beta 1$ en ausencia de estímulo es mayor que tras la exposición con CXCL12.

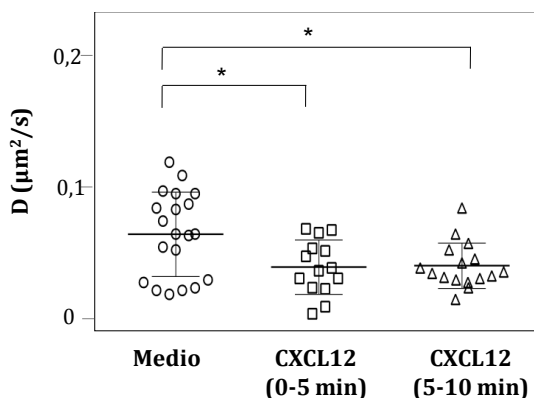


Figura 52. El coeficiente de difusión de cada célula individual fue analizado y representado en una gráfica de dispersión (16 células, $n=3$, $*p<0,05$).

A continuación, los coeficientes D de todas las trayectorias del conjunto de células fueron representados en un histograma semi-logarítmico, mostrando la distribución completa del comportamiento de difusión de las integrinas $\beta 1$. El

valor de corte para definir la población molecular móvil fue calculado observando la difusión sobre células fijadas. Dado que la posición de las sondas (QDots) no puede ser determinada con 100% de precisión debido a los errores intrínsecos del proceso de medición y al algoritmo usado para reconstruir las trayectorias, el valor de D tendrá siempre cierto error. Esto provoca que incluso aunque las células hayan sido previamente fijadas, el coeficiente de difusión no tenga valor cero, como podría esperarse, sino que existe cierta distribución de valores D . Así, el $D=D_{\text{mínimo}}$ por debajo del cual las partículas se considerarán inmóviles se define como aquel valor que deja a la izquierda del histograma el 95% de los coeficientes de difusión determinados por algoritmo sobre células fijadas. En nuestras condiciones experimentales este valor fue $D \leq 0,003 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (**Figura 53**).

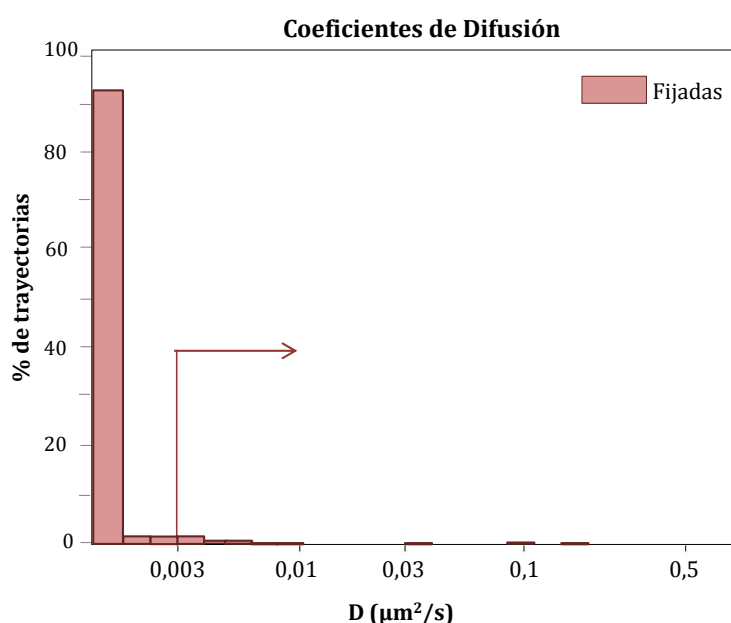


Figura 53. Distribución de los coeficientes de difusión D de las trayectorias de las integrinas $\beta 1$ de células fijadas.

Tras este primer análisis se analizó la distribución de los coeficientes de difusión de todas las trayectorias de las integrinas $\beta 1$ de células expuestas a diferentes condiciones. En condiciones basales se observan dos poblaciones moleculares: una población estacionaria minoritaria y una población móvil predominante. Notablemente, al estimular con CXCL12 se produjo un cambio significativo en la distribución de dichas poblaciones, mostrando una disminución general de la movilidad lateral de las integrinas $\beta 1$ (**Figura 54A**). Esta reducción de la población móvil vino acompañada de un incremento de la población de moléculas $\beta 1$ estacionaria, siendo este efecto mayor en los primeros minutos tras la estimulación con CXCL12. Como control positivo de activación de integrinas, las

células Molt-4 se expusieron a MnCl_2 (0,5 mM), lo que generó una población de integrinas $\beta 1$ mayoritariamente estacionaria (55%) (**Figura 54B**), lo que indica que la disminución de la movilidad de estas integrinas correlaciona con un incremento en su afinidad.

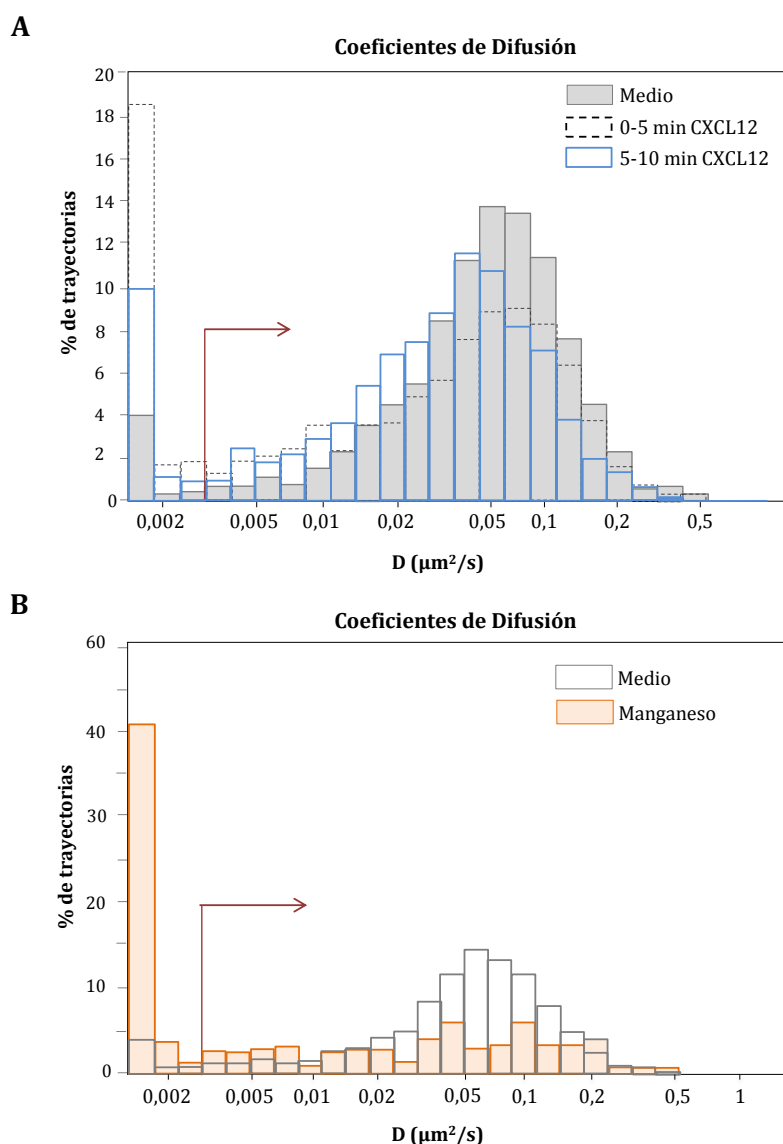
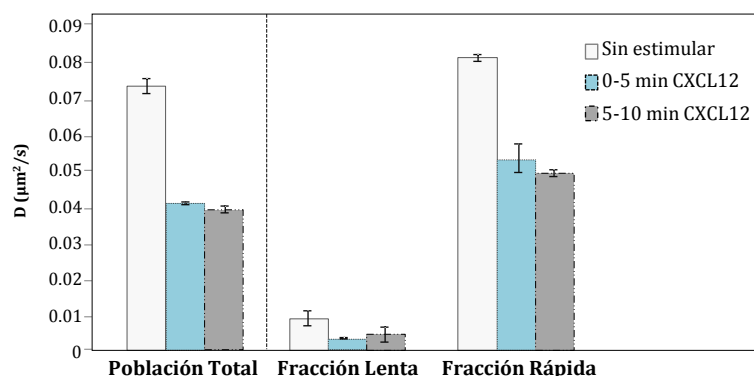


Figura 54. Distribución de los coeficientes de difusión D de todas las trayectorias de las integrinas $\beta 1$ representados en un histograma semi-logarítmico. Histograma del porcentaje de trayectorias con respecto a los coeficientes de difusión en presencia y ausencia de CXCL12 (**A**), y manganeso (**B**). (n=3-4, 16 células, 2000 trayectorias por condición). La flecha roja marca el valor de corte que define la población móvil con respecto a la población estacionaria.

Para comparar cuantitativamente las diferencias en el comportamiento difusivo de $\beta 1$, se calculó el **coeficiente de difusión medio de la población móvil total** en ausencia y presencia de quimioquina (la población estacionaria no se tiene

en cuenta al hacer este cálculo, considerándose su aportación nula). Para realizar esta cuantificación se determinó el coeficiente de difusión medio, tal y como se ha explicado en Materiales y Métodos. Como se puede observar al comparar los coeficientes D de la población móvil total (**Figura 55A izquierda y Tabla 10**), la difusión de la población total $\beta 1$ es mayor antes de estimular ($D=0,072$) que tras la estimulación con CXCL12 ($t<5$ min y $t>5$ min, $D=0,041$ y $D=0,039$, respectivamente). El ajuste MSD medio a la ecuación $\langle r^2 \rangle = 4Dt^\alpha$, nos proporciona también el valor del parámetro α , el cual indica el tipo de difusión. Así, $\alpha=1$ indica difusión normal; $\alpha<1$ subdifusión y $\alpha>1$ superdifusión (**ver Figura 51**). El coeficiente α obtenido antes de la estimulación con quimioquina se corresponde con una difusión al azar o normal ($\alpha=0,92$), pasando a tener un comportamiento ligeramente anómalo subdifusivo en presencia de CXCL12 ($\alpha=0,79$, $t<5$ min; $\alpha=0,81$, $t>5$ min) (**Tabla 10**).

A



B

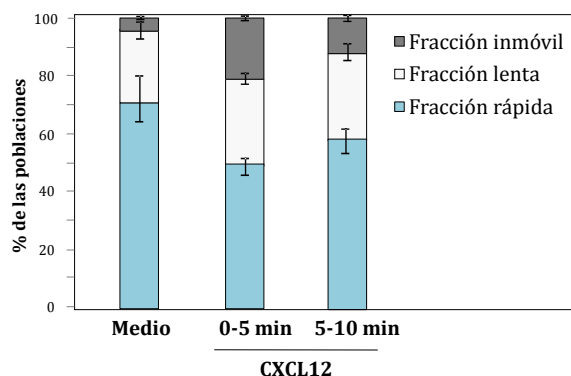


Figura 55. Análisis cuantitativo del comportamiento difusivo de las integrinas $\beta 1$ en presencia de CXCL12. **(A)** Coeficientes de difusión de la población total, fracción lenta y fracción rápida de $\beta 1$ en células Molt-4 antes y después de la estimulación con CXCL12. **(B)** Los porcentajes de las fracciones estacionaria y móvil (lenta y rápida) fueron calculados gracias al análisis CPD ($n=3-4$, 16 células, 2000 trayectorias por condición).

A continuación, con el fin de poder distinguir las dos subpoblaciones que conforman la **fracción móvil (lenta y rápida)**, se hizo un análisis de la **función de distribución acumulada** o CPD (*Cumulative Probability Distribution*) a tiempos largos. Los datos de difusión generados mediante este análisis revelaron un cambio en el comportamiento difusivo en la población móvil después de la estimulación con CXCL12. Así, el movimiento de ambas fracciones móviles (lenta y rápida), disminuyó en presencia de CXCL12, aunque los cambios más notables los podemos observar en la fracción móvil rápida de integrinas $\beta 1$, siendo ésta la mayoritaria (**Figura 55A, derecha**). Tras la estimulación con CXCL12 no se observaron apenas cambios entre los coeficientes de difusión D entre los periodos 0-5 y 5-10 min en ambas fracciones móviles.

Posteriormente, calculamos los respectivos porcentajes de las moléculas de integrinas $\beta 1$ que pertenecían a cada fracción: estacionaria y móvil (rápida y lenta) (**Figura 55B**). Como se había observado en el histograma generado previamente, la población inmóvil aumenta tras la estimulación con CXCL12 pasando de un 4,5% del total de la población a un 22% (0-5 min), y a un 12% del total (5-10 min). Los cambios observados en los porcentajes de la fracción lenta tras la estimulación con CXCL12 fueron modestos (de 25% a 30%), siendo la fracción rápida la que se vio reducida en presencia de quimioquina (de 71% a 48%), recuperándose levemente en los últimos 5 min en presencia de CXCL12 (58%) (**Figura 55B**). Por tanto, estos datos sugieren que la fracción móvil rápida es la más afectada en la disminución de la difusión total de las integrinas $\beta 1$ en respuesta a la quimioquina (**Tabla 10**).

	Medio	0-5min CXCL12	5-10min CXCL12
D ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	0,072 \pm 0,002	0,041 \pm 0,002	0,039 \pm 0,001
Valor α	0,93 \pm 0,02	0,79 \pm 0,04	0,81 \pm 0,01
Fracción Inmóvil (%)	4,5 \pm 0,5	22 \pm 1	12 \pm 1
D_{lenta} ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	0,0082 \pm 0,0005	0,0033 \pm 0,0001	0,0043 \pm 0,004
D_{rápida} ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	0,081 \pm 0,001	0,052 \pm 0,002	0,048 \pm 0,001
Subpoblación lenta (%)	25 \pm 3	30 \pm 2	30 \pm 3
Subpoblación rápida (%)	71 \pm 8	48 \pm 3	58 \pm 4

Tabla 10. Análisis de las poblaciones móviles y estacionarias de $\beta 1$ en condiciones basales y tras estimular con CXCL12. Los parámetros se muestran junto con la desviación estándar (n=3-4, 2000 trayectorias por condición).

2. Análisis del *clustering* de integrinas $\beta 1$ en respuesta a CXCL12 y VCAM-1

Tras la disminución observada mediante SPT de la movilidad de las integrinas $\beta 1$ en presencia de CXCL12, quisimos inicialmente estudiar posibles relaciones entre dicha disminución y el grado de activación de estas integrinas en presencia de quimioquina y/o VCAM-1. Dado que los análisis de SPT mostraron que los mayores cambios de movilidad de integrinas $\beta 1$ en respuesta a CXCL12 ocurrían en el intervalo entre 0-5 min, escogimos el tiempo de 2,5 min para los estudios de activación de $\beta 1$. Como primera aproximación, se realizaron ensayos de citometría de flujo utilizando el anticuerpo HUTS-21, el cual, como ya se ha mencionado anteriormente, reconoce conformaciones extendidas de la integrina $\beta 1$. La incubación de las células Molt-4 con CXCL12 y VCAM-1 durante 2,5 min se tradujo en un ligero aumento, aunque no estadísticamente significativo de la unión de HUTS-21. Este aumento es inferior al que normalmente obtenemos al incubar dichas células con CXCL12 durante 30 s (no mostrado). Sin embargo, la incubación de las células con la quimioquina y VCAM-1 reveló un incremento significativo de la unión de HUTS-21 a las moléculas $\beta 1$, indicando un aumento en el grado de activación de estas moléculas (**Figura 56A**). Como control positivo de la activación

de la integrina, las células fueron expuestas a MnCl_2 (0,5 mM), observándose un notable incremento en la conformación de alta afinidad de $\beta 1$.

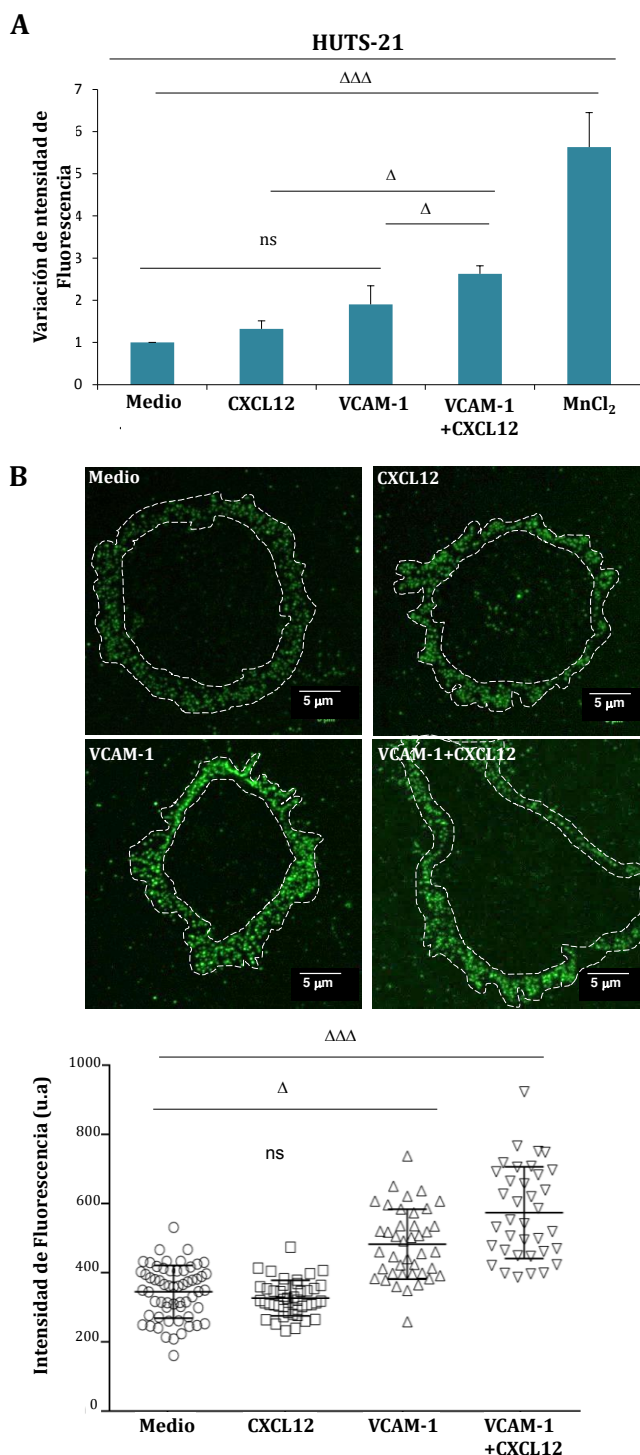


Figura 56. Análisis de la activación de $\beta 1$ en respuesta a CXCL12 y/o VCAM-1. Las células Molt-4 fueron analizadas mediante experimentos de citometría de flujo **(A)**, e inmunofluorescencia **(B)**, utilizando el anticuerpo HUTS-21. Se muestran gráfico muestra la imágenes representativas de células bajo distintos estímulos **(B, arriba)**, y la cuantificación de la fluorescencia celular por unidad de área **(B, abajo)** (60-100 células, n=3, $\Delta\Delta\Delta$ $p < 0,001$, Δ $p < 0,05$, u.a.: unidades arbitrarias).

A continuación, las células Molt-4 fueron incubadas en presencia de CXCL12 y/o VCAM-1 y analizadas posteriormente mediante microscopía confocal con el anticuerpo HUTS-21. Dichos experimentos fueron realizados en las mismas condiciones de tiempo y concentración de los estímulos que los ensayos de citometría de flujo. El análisis de las imágenes se hizo normalizando la intensidad de fluorescencia respecto al área, lo cual permitió la comparación directa entre las distintas condiciones. No pudimos detectar cambios significativos en la intensidad de fluorescencia de HUTS-21 tras la incubación celular con CXCL12, aunque sí se observó una menor variabilidad de los valores de intensidad de fluorescencia (**Figura 56B**). La conformación activa de $\beta 1$ se vio significativamente aumentada tras incubar con VCAM-1, así como tras la exposición a VCAM-1 y CXCL12, observándose en este caso un efecto sinérgico. Estos datos sugieren que la menor difusión de las integrinas $\beta 1$ en presencia de CXCL12 que se había observado en las condiciones experimentales de los análisis mediante SPT no vendría acompañada de un aumento estadísticamente significativo de la activación de la integrina, a no ser que las células se expusieran simultáneamente a CXCL12 y VCAM-1.

Posteriormente, las muestras de inmunofluorescencia fueron analizadas mediante microscopía de super-resolución STED (*Stimulated emission depletion* o microscopía de depleción por emisión estimulada) con el objetivo de determinar el grado de *clustering* en membrana de las integrinas $\beta 1$. La microscopía STED permite tomar imágenes con una resolución por debajo del límite de difracción del haz de luz, mejorando la resolución espacial permitida en la microscopía convencional (~ 100 nm en vez de 200 nm). Esta técnica usa dos láseres, uno de alta energía (como en la microscopía confocal) y un segundo láser de baja energía, el cual atenúa la emisión de la fluorescencia en el punto de excitación del primero. El resultado de esta combinación es una especie de rosquilla que sólo emite fluorescencia en el punto central³¹⁹. Para investigar la formación de *clusters* de integrinas $\beta 1$ se determinó en primer lugar el tamaño promedio de los *spots* fluorescentes de los mencionados análisis para cada condición. Para realizar este análisis se tomó como referencia basal los *spots* fluorescentes observados en el cristal, los cuales corresponden a los fluoróforos pegados al cristal de manera inespecífica. La cuantificación reveló que incluso esta técnica está limitada por la resolución espacial, ya que no se observaron diferencias de tamaño entre los *spots*

fluorescentes pegados al cristal y aquellos observados en presencia de medio y los diferentes estímulos utilizados (**Figura 57A**). De este modo no se pudo concluir la presencia de *clusters* de integrinas $\beta 1$ pero tampoco descartarlo, ya que éstos podrían ser más pequeños de 100 nm. Sí se pudo detectar un ligero aumento del tamaño de los *spots* fluorescentes especialmente en presencia de VCAM-1 y VCAM-1/CXCL12, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

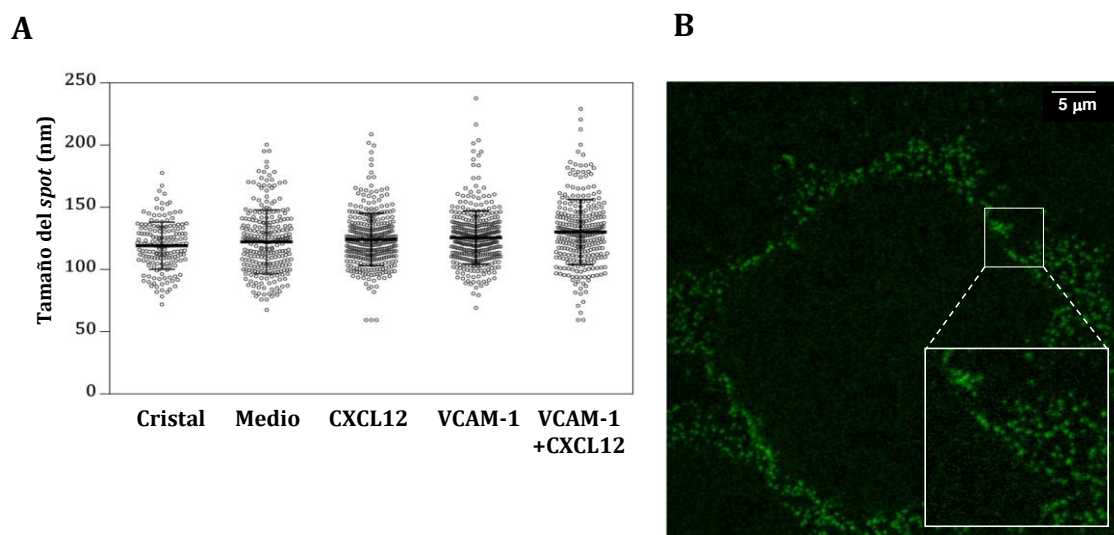


Figura 57. Procesamiento de las imágenes de nanoscopía de super-resolución STED de los ensayos de inmunofluorescencia. (A) Análisis del tamaño de los puntos o *spots* fluorescentes de integrinas $\beta 1$ de las imágenes de microscopía STED. **(B)** Imagen representativa de microscopía STED y ampliación de la imagen (n=3, 8 células/condición, >1000 puntos analizados).

A continuación, se cuantificó la intensidad de fluorescencia de cada *spot* de integrinas $\beta 1$ de las imágenes de microscopía STED que reconoció el sistema de procesamiento de las imágenes. De nuevo, se tomaron como referencia los *spots* fluorescentes inespecíficos pegados al cristal, considerándose su valor de intensidad de fluorescencia como el mínimo detectado. Pese a que los valores medios de intensidad de fluorescencia entre las distintas condiciones no mostraron diferencias significativas, se advirtió una clara tendencia a una mayor proporción de los *spots* que presentaban una mayor intensidad de fluorescencia en presencia de CXCL12, y en mayor medida tras los estímulos con VCAM-1 y VCAM-1/CXCL12 (**Figura 58A izquierda**). Esto indica que dichos *spots* fluorescentes estarían compuestos por un número mayor de moléculas $\beta 1$ en su conformación activa (HUTS-21). A su vez, se puede observar que en presencia de CXCL12, VCAM-

1 y la combinación VCAM-1/CXCL12 hay un aumento de la dispersión de los valores de la intensidad de fluorescencia (**Figura 58A derecha**).

Por último, se hizo un análisis de la distancia mínima entre las partículas o *spots* fluorescentes o *Near Neighbour Distance* (NND). Esta magnitud es inversamente proporcional a la concentración de partículas en un área determinada. Así, un valor bajo de NND indica una gran densidad de partículas con poca distancia entre ellas, y viceversa. Dicho análisis aplicado a nuestros datos se tradujo en una tendencia a una mayor densidad de integrinas $\beta 1$ activas en presencia de CXCL12, VCAM-1 y VCAM-1/CXCL12 relativo a la condición basal (Medio), dado que los valores de NND disminuyen (**Figura 58B izquierda**). A su vez, la variabilidad de la distancia mínima pareció reducirse en presencia de VCAM-1 y VCAM-1/CXCL12 (**Figura 58B derecha**). Estos resultados corroboran los datos del análisis de microscopía confocal, en las cuales se había mostrado una mayor intensidad de fluorescencia por unidad de área en presencia de VCAM-1 y VCAM-1/CXCL12 (**Figura 56B**). En conjunto estos datos nos sugieren la presencia de un mayor número de integrinas activas tras exponer las células Molt-4 a VCAM-1 y VCAM-1/CXCL12.

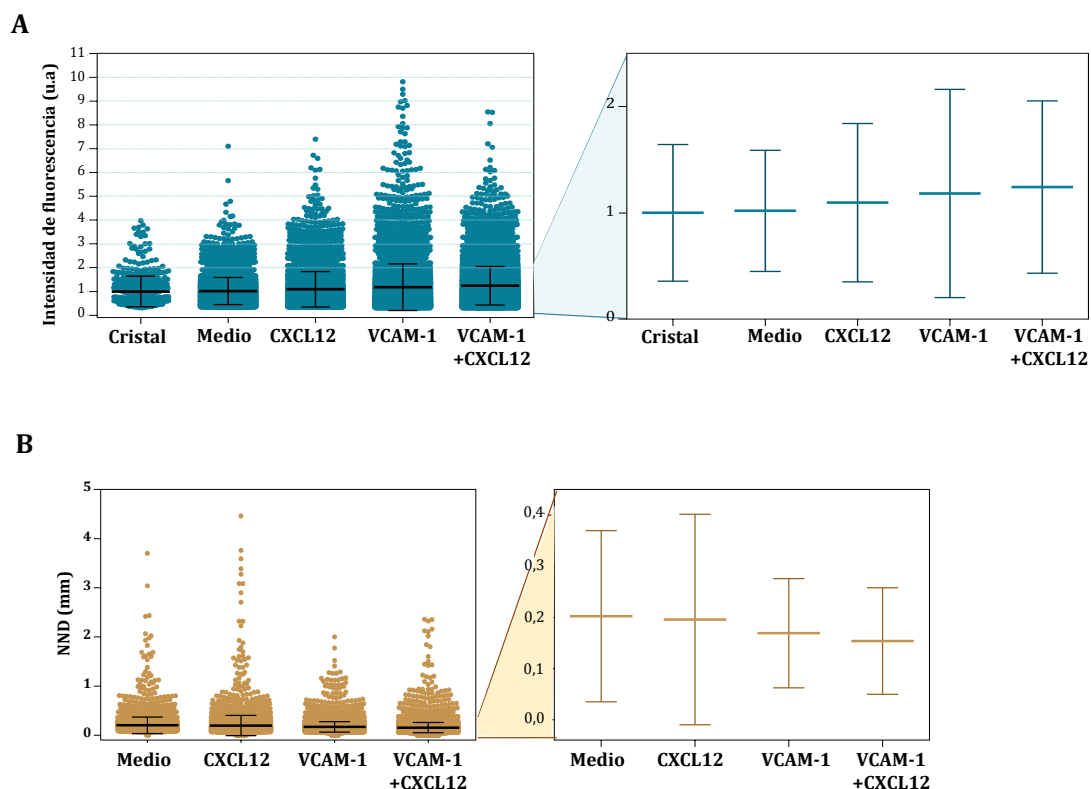


Figura 58. Análisis de las imágenes de microscopía de super-resolución STED de la intensidad de fluorescencia de los *spots* fluorescentes de integinas $\beta 1$ en presencia de CXCL12, VCAM-1 y VCAM-1/CXCL12. Se muestra la intensidad de los *spots* fluorescentes (A), así como las distancias mínimas entre ellos (NND) (B) ($n=3$, 8 células/condición, >1000 puntos analizados). A la derecha de ambos paneles se muestra una ampliación de las figuras de la izquierda, lo cual permite observar con más exactitud la varianza de los valores.

Discusión

1. Papel de SLP-76, ADAP y SKAP-1 en la regulación por quimioquinas de la adhesión dependiente de $\alpha 4 \beta 1$

La integrina $\alpha 4 \beta 1$ es una molécula de adhesión esencial en la migración de linfocitos T desde el compartimento sanguíneo hacia el interior de los tejidos en respuesta a infecciones y daño tisular. La estimulación de estos linfocitos con quimioquinas genera una señalización *inside-out* que se traduce en un aumento rápido y transitorio de la actividad de $\alpha 4 \beta 1$ ²⁷. Este aumento de actividad va asociado a cambios conformacionales en su porción extracelular que tienen lugar tras la interacción de proteínas tales como talina o kindlin-3 con los dominios citoplasmáticos de las subunidades β , traduciéndose en un incremento de la afinidad de $\alpha 4 \beta 1$ por sus ligandos y un posterior reforzamiento de la adhesión celular sobre el endotelio.

Un componente esencial de la señalización *inside-out* que regula la activación de $\alpha 4 \beta 1$ es la proteína Vav1^{187,220}. En trabajos anteriores nuestro grupo demostró que Vav1 se disocia de talina tras la estimulación con CXCL12, lo que contribuye a la interacción talina- $\beta 1$ que conduce finalmente a la estimulación de la actividad adhesiva de $\alpha 4 \beta 1$. Consecuentemente, es razonable proponer que las proteínas que se asocian con Vav1 podrían modular asimismo dicha adhesión. SLP-76 es una molécula adaptadora que interacciona basalmente con Vav1, y dicha interacción aumenta tras la estimulación del TCR^{240,241,294}. Por otra parte, ADAP se une al dominio SH2 de SLP-76²⁴⁰ por lo que podría asociarse indirectamente con Vav1. Asimismo, ADAP interacciona con SKAP-1, y se ha mostrado que esta última representa una molécula efectora dentro del módulo ADAP/SKAP-1²⁷⁵. En esta primera parte de la Discusión nos hemos centrado en el módulo SLP-76/ADAP, para enfocarlo más directamente por su capacidad de asociarse con Vav1. En la segunda parte se discutirán los resultados de nuestros estudios preliminares sobre el papel de SKAP-1 en la regulación por quimioquinas de la adhesión de linfocitos T mediada por $\alpha 4 \beta 1$. Se ha preferido separar ambas partes dado que la etapa en la que estamos en el estudio del módulo ADAP/SKAP-1 es demasiado temprana para

proponer conclusiones conjuntas con el módulo SLP-76/ADAP relativas a la regulación de la mencionada adhesión.

En la presente Tesis mostramos que SLP-76 y ADAP contribuyen a una óptima estimulación por CXCL12 de la adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$ de células T en condiciones de flujo. La implicación de SLP-76 y ADAP en esta adhesión correlaciona con la estimulación por CXCL12 de la asociación de Vav1 con dichas proteínas, lo que sugiere que las dinámicas de asociación entre Vav1, SLP-76 y ADAP podrían regular la adhesión mediada por $\alpha 4\beta 1$ en linfocitos T.

Utilizando ensayos de adhesión estática observamos que la depleción de ADAP en células T redujo significativamente la adhesión estimulada por CXCL12 sobre VCAM-1 y FN-H89. Por contra, el silenciamiento de SLP-76 no afectó la adhesión sobre VCAM-1 aunque sí provocó una disminución parcial de la adhesión sobre FN-H89. Los ensayos de adhesión en condiciones de flujo mostraron que las células T deficientes tanto en ADAP como en SLP-76 presentaban una disminución de su adhesión estable a VCAM-1/CXCL12. De modo similar, se ha mostrado que SLP-76 juega un papel importante en la regulación por CXCL12 de la adhesión de células T a ICAM-1 en condiciones flujo pero no en condiciones estáticas²⁶⁴. Los diferentes resultados de adhesión a VCAM-1 en condiciones estáticas y de flujo en células silenciadas para SLP-76 es similar a lo observado previamente con células deficientes en DOCK2³²⁰. Estos resultados sugieren que el estrés que provoca el flujo puede resaltar defectos de adhesión que no pueden detectarse en condiciones más permisibles, como es el caso de la adhesión estática.

La disminución en la adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$ de los linfocitos T deplecionados para SLP-76 o ADAP no se correlacionó con alteraciones en la afinidad de $\alpha 4\beta 1$. Por el contrario, experimentos de adhesión en condiciones de flujo mostraron que la fuerza de la adhesión celular a VCAM-1/CXCL12 era regulada por SLP-76 y ADAP aunque a niveles diferentes. Así, comprobamos que dicha fuerza en los transfectantes silenciados para ADAP era menor que la de las células deplecionadas para SLP-76. Comparado con el requerimiento absoluto de talina y Vav1 en el control de la afinidad de $\alpha 4\beta 1$ y en el reforzamiento de la adhesión de linfocitos T estimulados con CXCL12, la contribución de SLP-76 y ADAP en estos procesos parece ser de menor magnitud. Sin embargo, ambas proteínas son claramente necesarias para alcanzar una óptima estabilidad de dicha

adhesión.

El *spreading* celular representa una fase tardía en el proceso de adhesión dependiente de integrinas que correlaciona con la polimerización de actina posterior al reforzamiento de la adhesión. El análisis del papel de SLP-76 y ADAP en el *spreading* de células T sobre VCAM-1/CXCL12 reveló una función estimuladora de ambas proteínas. En conjunto, estos datos señalan la importancia de ADAP como modulador del reforzamiento de la adhesión y el posterior *spreading* linfocitario dependiente de $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a quimioquinas, mientras SLP-76 estaría implicado fundamentalmente en el proceso de *spreading* celular.

Resultados previos de nuestro laboratorio habían revelado que la activación de Rac1 en linfocitos T está mediada por Vav1, lo cual representa un importante evento para el reforzamiento de la interacción $\alpha 4\beta 1$ -VCAM-1, así como para el *spreading* celular¹⁸⁷. Hemos observado que el silenciamiento de ADAP o de SLP-76 provoca una activación deficiente de Rac por CXCL12 en células T. Adicionalmente, la depleción de ADAP retrasa la asociación Vav1-SLP-76 e inhibe la activación de Rac1 en respuesta a CXCL12. Significativamente, la expresión de una forma constitutivamente activa de Rac (Rac-V12) en células Molt-4 deficientes en SLP-76 o ADAP revertió la pérdida de adhesión de estos transfectantes, indicando que Rac1 es un mediador común en la modulación por SLP-76 y ADAP de la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4\beta 1$. Estos datos sugieren que SLP-76 y ADAP funcionan probablemente como adaptadores que optimizan la activación de Rac promovida por Vav1 en linfocitos T, así como la estimulación de la adhesión y *spreading* celular mediado por $\alpha 4\beta 1$. Se ha indicado anteriormente que la asociación de SLP-76 con Vav1 y Nck contribuye a la activación de Rac estimulada por TCR^{321,322}. Asimismo, ADAP se une a estos complejos junto con WASP^{252,271}, y coopera junto con Nck en el reclutamiento de SLP-76 y en la regulación de la reorganización del citoesqueleto de actina mediada por la GTPasa Rho²⁶⁶.

Pyk2 es una proteína quinasa que interacciona con Vav1 en linfocitos T³⁰⁴. En un estudio paralelo en el laboratorio confirmamos dicha asociación, y mostramos asimismo que Pyk2 se asocia con SLP-76 y talina. Adicionalmente, observamos que Pyk2 no regula la afinidad de $\alpha 4\beta 1$, aunque comprobamos que era capaz de regular la avidéz de esta integrina (ver Anexo I). En contraste con la regulación positiva por SLP-76 y ADAP de la activación de Rac1 por CXCL12,

observamos que el silenciamiento de Pyk2 se traducía en una activación de Rac1 de mayor intensidad y más sostenida en el tiempo (Anexo I). Estos resultados indican que Pyk2 regula negativamente la activación de Rac1 y la adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a CXCL12. En conjunto, todos estos datos muestran que Rac1 es un mediador común de SLP-76, ADAP y Pyk2 en la adhesión de linfocitos T estimulada por quimioquinas a ligandos de $\alpha 4\beta 1$. Como se ha mencionado, SLP-76 y ADAP regularían positivamente junto con Vav1 la estimulación por CXCL12 de la activación de Rac1 y la adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$, mientras que Pyk2 inhibiría esta adhesión limitando la activación de Rac1. Pudimos asimismo comprobar que la regulación negativa de Pyk2 sobre la activación de Rac1 y sobre la adhesión celular sobre VCAM-1 se oponía a la actividad estimuladora de ADAP en estos procesos, como se observó en células silenciadas para ambas proteínas. Los resultados sugieren que en estas condiciones experimentales, la ausencia de Pyk2 podría rescatar la activación de Rac1 al mismo tiempo que contrarrestaría los efectos inhibitorios de la bajada de ADAP, conllevando una estimulación de la adhesión sobre VCAM-1.

Resultados anteriores de nuestro laboratorio indicaron que CXCL12 estimula la fosforilación en tirosinas de Vav1, lo cual promueve la activación de Rac1 y la adhesión mediada por $\alpha 4\beta 1$ en linfocitos T¹⁸⁷. En el presente trabajo hemos detectado una fosforilación defectuosa de Vav1 en linfocitos T deplecionados para SLP-76 asociado a una inhibición en la activación de Rac1. Por contra, las células silenciadas para ADAP mostraron una eficiente fosforilación de Vav1 en respuesta a CXCL12, a pesar de la inhibición en la activación de Rac1. Estos resultados podrían reflejar el hecho de que ADAP no interacciona directamente con Vav1, pero se asocia con el módulo Vav1-SLP-76 posiblemente a través de SLP-76. Por otra parte, el aumento de la activación de Rac1 en respuesta a CXCL12 en células deplecionadas para Pyk2 no estaba asociado a un aumento de la fosforilación de Vav1, sino que dicha fosforilación no fue tan eficiente como los transfectantes control. Estos datos revelan que SLP-76 y Pyk2, pero no ADAP, contribuyen a una óptima fosforilación de Vav estimulado por CXCL12 en linfocitos T, e indican que la activación final de Rac1 es el resultado de mecanismos tanto dependientes como independientes de Vav1.

Desconocemos por el momento cuáles son los mecanismos implicados en

las distintas respuestas de activación de Rac1 en células silenciadas para SLP-76 o Pyk2 a pesar de la ineficiente fosforilación de Vav1 por CXCL12 observado en estos transfectantes. Es posible que la depleción de SLP-76 y Pyk2 altere la asociación y/o función de tirosín-quinasa implicadas en la fosforilación de Vav1, como ZAP-70 o Lck^{323,324}. Aún así, la posterior activación de Rac1 en estos transfectantes está diferencialmente regulada y posiblemente implica distintas proteínas GEF y GAP. En relación a este punto, se ha observado que la proteína GEF DOCK2 y la proteína GAP β -quimerina regulan la activación de Rac por quimioquinas y la adhesión de linfocitos T dependiente de $\alpha 4\beta 1$ ^{320,325}. DOCK2 coopera con Vav1 en la activación de Rac promovida por quimioquinas, y su silenciamiento conlleva defectos en la adhesión de linfocitos T mediada por $\alpha 4\beta 1$ en condiciones de flujo. Por el contrario, la sobreexpresión de β -quimerina en linfocitos T se traduce en inhibición de la activación de Rac en respuesta a CXCL12, asociada con la inhibición de la adhesión celular a ligandos de $\alpha 4\beta 1$. Aunque no se ha estudiado, existe la posibilidad de que DOCK2 y β -quimerina pudieran ser reclutadas al módulo Vav1-Pyk2-SLP-76-ADAP, contribuyendo a la regulación de la actividad de Rac y la subsecuente adhesión celular dependiente de $\alpha 4\beta 1$. Otras GEFs y GAPs expresadas en linfocitos T que regulan la activación de Rac incluyen PlekhG2, Pix y ArhGAP15³²⁶⁻³²⁸, aunque su papel en dicha adhesión no ha sido estudiado.

Tras caracterizar la modulación por SLP-76 y ADAP de la adhesión de linfocitos T mediada por $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a CXCL12, hemos iniciado recientemente un estudio para analizar la posible implicación en este proceso de SKAP-1, una proteína que interacciona con ADAP. Como se ha indicado al principio de esta Discusión, hemos preferido presentar y discutir inicialmente los resultados en el contexto de las relaciones entre Vav1, SLP-76 y ADAP, y en esta segunda sección de la Discusión se discutirán los resultados obtenidos del estudio del papel de SKAP-1 en la adhesión linfocitaria mediada por $\alpha 4\beta 1$ en relación con sus conexiones funcionales con ADAP.

Un punto importante a tener en cuenta cuando se comparan las funciones de ADAP y SKAP-1 es que la expresión de esta última es dependiente de ADAP. Así, se ha demostrado que linfocitos T que carecen de ADAP muestran una ausencia prácticamente total de la expresión de SKAP-1^{275,277,278}. Esto es debido a que ADAP estabiliza la expresión de SKAP-1, por lo que la ausencia de la primera se traduce

en degradación de SKAP-1²⁷⁷. Estas observaciones han llevado a proponer que las células *knock-out* para ADAP se comportan asimismo como *knock-out* para SKAP-1. Por otro lado, los linfocitos T que carecen de SKAP-1 muestran niveles de expresión normales de ADAP²⁷⁵. Como se ha mencionado anteriormente, estudios comparativos de las funciones de estas dos proteínas han concluido que dentro del módulo ADAP-SKAP-1, SKAP-1 actuaría como un efector de ADAP. En cualquier caso, dado que ambas proteínas tienen distintos *partners* de interacción que posiblemente no compartan en un contexto espacio-temporal, se conocen poco todavía las distintas funciones de estas dos proteínas en los diferentes complejos en los que puedan formar parte. Así, poco se sabe de las relaciones funcionales entre SLP-76, ADAP y SKAP-1, aunque se ha mostrado que la primera contribuye a la localización del complejo ADAP/SKAP-1/RIAM en la membrana de linfocitos T²⁶⁴.

Nuestros experimentos de adhesión realizados tanto en condiciones estáticas como de flujo utilizando linfocitos T SKAP-1^{-/-}, células Molt-4 silenciadas para SKAP-1 o aquellas que sobre-expresan esta proteína indicaron que la estimulación por CXCL12 de la adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$ requiere SKAP-1. Análisis de las etapas de la adhesión que podrían estar moduladas por SKAP-1 revelaron que la estimulación por CXCL12 de formas de alta afinidad de esta integrina es independiente de SKAP-1. Por el contrario, la fuerza de la adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$ en condiciones de flujo fue inferior en células deficientes en SKAP-1 en comparación con células control, lo que sugiere que esta proteína modula la etapa de reforzamiento de dicha adhesión. En línea con estos resultados, la mayor motilidad sobre VCAM-1 de linfocitos T SKAP-1^{-/-} con respecto a ratones *wt* sugiere una adhesión inestable a dicho ligando que podría contribuir a este incremento en la motilidad celular.

La inestabilidad de la adhesión mediada por $\alpha 4\beta 1$ de las células T deficientes en SKAP-1 es independiente de defectos en la interacción directa $\alpha 4\beta 1$ /VCAM-1, ya que la unión de $\alpha 4\beta 1$ con VCAM-1-Fc soluble no resultó afectada en estas células. Aunque no se puede descartar que existan alteraciones de la avidéz de esta integrina que no hayamos podido detectar, cabe la posibilidad de que posibles cambios en otras respuestas celulares afecten indirectamente a la adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$. La mayor motilidad sobre VCAM-1/CXCL12 de

linfocitos SKAP-1^{-/-} sugiere la posible estimulación de mecanismos relacionados con activación de migración celular. En línea con esta hipótesis, hemos observado una mayor activación de la GTPasa RhoA y un aumento en la fosforilación de MLC (pMLC) en los linfocitos T SKAP-1^{-/-}. La estimulación de la vía RhoA-pMLC está implicada en activación de la polarización, contractibilidad y migración celular³²⁹, por lo que su activación podría representar un mecanismo que estimulara la migración linfocitaria y representara una fuerza opuesta a la adhesión de estas células sobre VCAM-1.

Adicionalmente al aumento de RhoA mostrado por los linfocitos T SKAP-1^{-/-}, éstos exhibieron mayor activación de Rac, indicando que SKAP-1 tiene un papel represor en la activación de Rac y RhoA. Aunque nuestros estudios con otras proteínas implicadas en la señalización *inside-out* activada por quimioquinas que regula la adhesión mediada por $\alpha 4\beta 1$ indican que un aumento en la activación de Rac facilitaría la adhesión de linfocitos T, la mayor activación de esta GTPasa en linfocitos T SKAP-1^{-/-} está asociada a la mencionada disminución de la adhesión a VCAM-1. Una posible explicación para estos diferentes resultados podría ser que el incremento de la activación de Rac en estos linfocitos y un teórico aumento de su adhesión mediado por $\alpha 4\beta 1$ podría quedar oscurecido por el aumento de la estimulación de la vía RhoA-pMLC que indujera mayor motilidad por la mayor contractibilidad celular, oponiéndose a dicha adhesión. Por tanto, como se hipotetizaba más arriba, la reducción de la adhesión mediada por $\alpha 4\beta 1$ de células T deficientes en SKAP-1 podría ser un efecto indirecto del aumento de la activación de la vía RhoA-pMLC. Una aproximación experimental que se llevará a cabo próximamente es la de expresar formas dominantes negativas de RhoA en las células T para determinar si la adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$ podría ser rescatada, lo que apoyaría la hipótesis de que la sobre-activación de RhoA tendría un efecto indirecto en dicha adhesión.

Como se indicaba más arriba, cuando se llevó a cabo el análisis del papel de SLP-76 y ADAP en la estimulación por quimioquinas de la adhesión de linfocitos T dependiente de $\alpha 4\beta 1$, no habíamos iniciado el estudio de la posible implicación de SKAP-1 en este proceso. La pregunta que surge ahora, y teniendo en cuenta las relaciones de expresión y función entre ADAP y SKAP-1 apuntadas anteriormente, es si los defectos en la adhesión mediada por $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a CXCL12

mostrada por las células T deficientes en ADAP son debidos a la pérdida de expresión y función de SKAP-1. El grado de disminución de adhesión estática y en condiciones de flujo a ligandos de $\alpha 4\beta 1$ mostrado por células deficientes en ADAP y SKAP-1 es bastante similar. Asimismo, ninguno de los dos tipos celulares presenta alteraciones en la afinidad de $\alpha 4\beta 1$ ni en su capacidad de interactuar con VCAM-1-Fc soluble. Aunque los resultados de *spreading* con linfocitos T SKAP-1^{-/-} son algo preliminares, la ausencia de alteraciones en este proceso contrasta con la inhibición del *spreading* mostrado por las células T deplecionadas para ADAP. Está claro que en la etapa que estamos en el estudio con SKAP-1 no nos permite responder todavía a la pregunta propuesta ni proponer modelos hipotéticos.

Asimismo, hay una serie de observaciones experimentales que necesitan ser analizadas más a fondo. Así, el silenciamiento de ADAP en células T debería traducirse en disminución en la expresión de SKAP-1, y de acuerdo con nuestros resultados más recientes, en un aumento de la activación de Rac1. Sin embargo, la depleción de ADAP produce, por el contrario, una disminución en la activación de esta GTPasa que correlaciona con una menor asociación SLP-76-Vav1. Dado que la ausencia de expresión de SKAP-1 no altera la expresión de ADAP, y habiendo observado que CXCL12 induce una reducción en la asociación de SKAP-1/ADAP en paralelo a un aumento de la asociación ADAP/SLP-76/Vav1, estos datos abren la posibilidad de que el módulo SKAP-1/ADAP podría actuar como un freno en la asociación SLP-76-ADAP y en la activación de Rac. De acuerdo a esta hipótesis, en ausencia de SKAP-1, podría haber una mayor asociación ADAP/SLP-76 que promoviera finalmente la activación de Rac dependiente de estimulación por Vav1. De este modo, sería importante analizar las asociaciones entre Vav1, SLP-76 y ADAP en células deficientes en SKAP-1, así como estudiar la posible existencia de un macro-complejo compuesto por Vav1, SLP-76, ADAP y SKAP-1, y la dinámica de estas asociaciones en respuesta a quimioquinas.

Evidentemente pueden existir otras explicaciones alternativas. Es posible que las asociaciones ADAP/SKAP-1 y ADAP-SLP-76 no formen parte de un complejo común, sino que existan diferentes poblaciones espacio-temporales de estos complejos que pudieran depender de la acción de diferentes estímulos. No se ha estudiado en la presente Tesis si la localización de SKAP-1 varía tras

estimulación con quimioquinas. En relación con el módulo ADAP-SKAP-1, se ha descrito recientemente que está presente en linfocitos T de ratón como parte de dos complejos^{276,278,279}. Uno de estos complejos contiene dicho módulo asociado a RAPL y Mst-1, mientras que otro complejo molecular incluye RIAM, Kindlin-3 y Mst-1, además de ADAP-SKAP-1. Notablemente, RIAM interacciona directamente con SKAP-1 además de con talina^{279,330}, y representa un puente molecular entre ADAP-SKAP-1 y talina²⁸², la cual activa directamente a las integrinas. La interacción ADAP-SKAP-1 es importante para la regulación de la adhesión a ICAM-1 y fibronectina dependiente de integrinas $\beta 2$ y $\beta 1$ tras estimulación del TCR²⁸⁹. Teóricamente, la deficiencia en la expresión de ADAP, y por consiguiente la ausencia de SKAP-1, se traduciría en una potencial inhibición del reclutamiento del complejo ADAP-SKAP-1-RIAM a la membrana celular, y un posterior bloqueo de la estimulación de Rap1, la cual activa la adhesión mediada por LFA-1. No hemos estudiado el papel de SKAP-1 en el complejo ADAP-SKAP-1-RIAM-Rap1, ya que la implicación de Rap1 y RIAM en la modulación de la adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$ es bastante modesta³³⁰. Asimismo, no hemos analizado todavía una posible asociación de Vav1/SLP-76 con el complejo ADAP-SKAP-1-RIAM.

Otra vía de investigación que permanece abierta es el estudio de los mecanismos implicados en la regulación por el módulo ADAP-SKAP-1 de la activación de Rac1 y RhoA. En cuanto a Rac1, los GEF y GAP DOCK2 y β -quimerina, respectivamente, ya mencionados anteriormente, serían los candidatos iniciales a investigar. En relación a RhoA, tres GEFs han sido descritos en células T, Vav2, p115 RhoGEF y GEF-H1, y que pudieran regular la activación de esta GTPasa. Las posibles conexiones de estos GEFs y GAPs con el módulo ADAP-SKAP-1 serán objeto de estudios futuros.

A continuación se muestra un modelo del papel de SLP-76, ADAP y SKAP-1 en la regulación de la adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 1$ mediada por quimioquinas en la **Figura 59**.

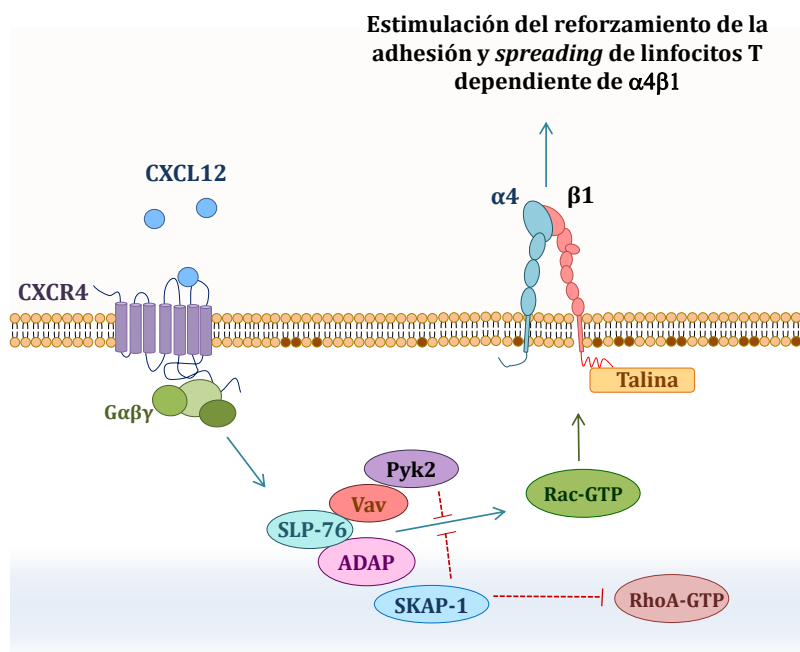


Figura 59. Modelo del papel de proteínas asociadas a Vav1 en la regulación de la adhesión dependiente de $\alpha 4 \beta 1$ mediada por quimioquinas.

2. Papel de ICAP-1 en la regulación de la adhesión dependiente de $\alpha 4 \beta 1$

La actividad de las integrinas está principalmente regulada a través de la interacción de proteínas activadoras o inhibidoras con la cola citoplasmática de las subunidades $\beta 27$. Un paso clave en la activación de las integrinas de los leucocitos es la unión de talina y kindlin-3 a los dominios citoplasmáticos de las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2^{32,35,49}$. Dicha unión podría ser contrarrestada por moléculas que potencialmente compiten con estas proteínas activadoras, como es el caso de la proteína ICAP-1^{35,47}, y que, por tanto, podría ser relevante en el proceso de adhesión. Así, trabajos previos han demostrado que ICAP-1 inhibe la unión de talina al dominio citoplasmático de $\beta 1$ en fibroblastos, desorganizando las adhesiones focales e inhibiendo la adhesión⁸⁶.

Utilizando ensayos de adhesión celular a VCAM-1/CXCL12, tanto en condiciones estáticas como de flujo, observamos que la ausencia de ICAP-1 en linfocitos T se tradujo en un aumento significativo de dicha adhesión. El aumento de adhesión dependiente de $\alpha 4 \beta 1$ de los linfocitos T que carecen de ICAP-1 no causó mayor *spreading* celular que el mostrado por células control. Por el contrario, dicho incremento de adhesión correlacionó con un aumento de la afinidad de $\alpha 4 \beta 1$, tal y como mostraron los experimentos de citometría de flujo

con el anticuerpo HUTS-21. Adicionalmente, los datos obtenidos al analizar la fuerza de adhesión a VCAM-1/CXCL12 en condiciones de flujo revelaron que dicha fuerza tiene niveles similares entre linfocitos T ICAP-1 $-/-$ y ICAP-1 $+/+$. Todos estos resultados indican que ICAP-1 juega un papel importante en las primeras etapas de la adhesión regulando negativamente la activación de $\alpha 4\beta 1$. Nuestros datos concuerdan asimismo con la observación de que ICAP-1 inhibe la activación del estado de alta afinidad de $\beta 1$ en células endoteliales ³³¹.

Se ha mostrado en fibroblastos que ICAP-1 se une a Rac1 y Cdc42, habiéndose propuesto que ICAP-1 sería un regulador negativo de dichas GTPasas, al actuar como un inhibidor de la disociación de los nucleótidos de guanina para ellas, pero no así para RhoA⁸⁸. Dado que Rac1 modula especialmente la fase de reforzamiento de la adhesión de linfocitos T mediada por $\alpha 4\beta 1$, y nuestros resultados indican que ICAP-1 no regularía dicha etapa, nuestros datos sugieren que el control por ICAP-1 de la adhesión a ligandos de $\alpha 4\beta 1$ sería independiente de la actividad de Rac1. Aún así, analizaremos en un futuro próximo el nivel de activación de Rac1 en el contexto de pérdida de expresión de ICAP-1.

Nuestros experimentos preliminares de co-inmunoprecipitación no han encontrado claras evidencias de competición entre talina y kindlin-3 con ICAP-1 en la asociación a la subunidad $\beta 1$. Los resultados indican que la asociación de $\beta 1$ con talina y kindlin-3 en respuesta a CXCL12 es rápida, tal y como se había mostrado en trabajos previos en leucocitos^{188,332}, y tiene lugar antes de la estimulación de la asociación $\beta 1$ -ICAP-1, sin pérdida de la unión de $\beta 1$ con talina y kindlin-3. ICAP-1 interacciona asimismo con CCM1 y CCM2⁹⁹, por lo que las dinámicas de asociación/disociación entre $\beta 1$ y ICAP-1 en relación con la interacción de ICAP-1 con CCM1 y CCM2 merecen ser analizadas en profundidad.

Se ha observado en fibroblastos que ICAP-1 tiene funciones independientes según sea su localización citoplasmática o nuclear⁹⁷. Así, se ha sugerido que podría actuar como un mensajero entre los sitios de adhesión dependientes de integrinas y el núcleo, con el propósito de controlar la expresión génica y la proliferación celular en fibroblastos y células epiteliales⁹⁷. Asimismo, se ha observado en osteoblastos y fibroblastos que la fosforilación de ICAP-1 por parte de CaMKII es necesaria para la ruptura de la interacción intramolecular entre los dominios N- y C-terminal de ICAP-1, lo cual desenmascara el dominio PTB permitiendo a ICAP-1

unirse a la subunidad $\beta 1$ ^{96,333}. Partiendo de estas observaciones, sería interesante conocer en linfocitos T el nivel de fosforilación de ICAP-1, los distintos *pools* celulares que existen en relación con su localización, y su función en el núcleo en presencia de ligando y/o quimioquina.

Uno de los objetivos futuros de nuestro estudio sobre ICAP-1 concierne su papel en diferenciación y función en células del sistema inmune, en relación con la actividad de $\alpha 4\beta 1$. La primera aproximación experimental que hemos llevado a cabo ha consistido en comparar las poblaciones leucocitarias en sangre periférica de ratones ICAP-1 $-/-$ e ICAP-1 $+/+$. Los resultados de los análisis de sangre no han mostrado diferencias significativas entre las distintas poblaciones celulares. Hemos iniciado ya un análisis comparativo de poblaciones de linfocitos T y B en bazo, nódulos linfáticos, timo y médula ósea, lo cual formará parte de futuros trabajos. Por el momento, en la presente Tesis hemos mostrado que tras la activación del TCR de linfocitos T ICAP-1 aislados de bazo, su proliferación estaba parcialmente impedida. Los mecanismos asociados a esta disminución serán asimismo explorados próximamente.

3. Dinámicas de difusión y movilidad lateral de las integrinas $\beta 1$

Los cambios conformacionales de las integrinas están asociados con variaciones en la afinidad y avidéz por sus ligandos^{334,335}. La relación entre la conformación de las integrinas y la regulación de su movilidad lateral ha sido objeto de pocos estudios hasta la fecha. Por ejemplo, se ha mostrado que los cambios en la distribución lateral de $\alpha L\beta 2$ contribuyen a la regulación de la avidéz que afecta a las propiedades adhesivas de esta integrina^{336,337}. Sin embargo, poco se sabe sobre la difusión lateral de $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a diferentes estímulos. Dado que CXCL12 promueve señalización *inside-out* que finaliza en la activación de $\alpha 4\beta 1$ y en aumento de adhesión de linfocitos T, en este trabajo nos planteamos un estudio de las dinámicas de difusión de $\beta 1$ en presencia de CXCL12, teniendo en cuenta que $\alpha 4\beta 1$ es la integrina $\beta 1$ mayoritaria en células T.

Los resultados obtenidos en los ensayos de *Single Particle Tracking* (SPT) mostraron que en condiciones basales, la difusión lateral de la población $\beta 1$ total se ajusta a un movimiento browniano al azar, observándose dos subpoblaciones bien diferenciadas: una fracción estacionaria minoritaria y una subpoblación móvil

rápida, la cual es mayoritaria. Tras estimular con CXCL12, el comportamiento difusivo de las integrinas $\beta 1$ cambió, disminuyendo el coeficiente de difusión de la población total, y aumentando notablemente la fracción de moléculas $\beta 1$ estacionarias. Un análisis a fondo de las subpoblaciones lenta y rápida dentro de la población inicial de moléculas $\beta 1$ móviles indicó que la subpoblación rápida es la que mayoritariamente disminuye su difusión tras incubación celular con la quimioquina. Por tanto, dicha subpoblación es la responsable del aumento de la población de integrinas $\beta 1$ estacionarias con menor coeficiente de difusión en respuesta a dicho estímulo. Notablemente, dicho aumento correlacionó con un claro incremento de la población de integrinas $\beta 1$ estacionarias cuando las células se incubaron en presencia de Mn^{2+} , el cual genera conformaciones activas de estas integrinas. Estos datos indican que la reducción de la movilidad de las moléculas de $\beta 1$ al exponer las células a CXCL12 se asocia directamente a un aumento en su afinidad.

Los resultados obtenidos con la técnica SPT nos llevaron a continuación a analizar mediante microscopía confocal de alta resolución si existían correlaciones entre el aumento de la población de integrinas $\beta 1$ estacionarias tras incubación celular con CXCL12, y un posible aumento del número de estas moléculas en conformaciones activas realizando *clustering* molecular. Dado que en los ensayos SPT se observó que el mayor aumento de la población estacionaria de integrinas $\beta 1$ ocurría durante el período 0-5 min de exposición a CXCL12, elegimos un tiempo de 2,5 min para los análisis de microscopía confocal. Este tiempo es claramente superior a los 30 s en los que se consigue el pico máximo de detección de conformaciones activas de estas integrinas mediante citometría de flujo, utilizando el anticuerpo HUTS-21. Tal y como esperábamos, los experimentos de citometría de flujo revelaron un aumento bastante modesto de la población de integrinas $\beta 1$ reactivas a HUTS-21 tras incubación celular durante 2,5 min con CXCL12, confirmando que la adquisición de formas activas de estas moléculas en respuesta a quimioquinas es un proceso muy rápido y transitorio. En línea con estos resultados, los análisis combinados de citometría de flujo y microscopía confocal mostraron un aumento de intensidad de fluorescencia de las moléculas $\beta 1$ reactivas a HUTS-21 especialmente cuando las células se expusieron durante 2,5 min a la combinación CXCL12/VCAM-1. Estos datos indican que se produce un

aumento del número de moléculas $\beta 1$ con conformaciones de alta afinidad tras la combinación con dichos estímulos, y sugeriría que la presencia del ligando estabilizaría dichas conformaciones. En la actualidad se están llevando a cabo estudios de SPT para determinar la difusión lateral de las integrinas $\beta 1$ en células incubadas con VCAM-1 o con la combinación CXCL12 y VCAM-1, lo que aumentará nuestro conocimiento de la movilidad de $\alpha 4\beta 1$ en la membrana de células T expuestas a estímulos activadores de adhesión, así como a sus propios ligandos.

De modo similar a nuestros resultados, se ha mostrado que las distintas conformaciones de $\alpha L\beta 2$ tienen diferentes perfiles de difusión, y que estos perfiles varían según el estado de activación celular³³⁶. Asimismo, existe una correlación entre la activación de $\alpha L\beta 2$ con su movilidad reducida en presencia de ICAM-1 y quimioquina en células dendríticas³³⁸, y se ha observado en linfocitos T que la unión de $\alpha L\beta 2$ a ICAM-1 multivalente reduce notablemente su movilidad³³⁷. Adicionalmente, se ha mostrado que el coeficiente de difusión medio de las integrinas en las adhesiones focales es significativamente menor que el que presentan fuera de estas estructuras³³⁹. Cabe destacar que al analizar individualmente los coeficientes de difusión de integrinas $\beta 1$ en cada célula hemos observado una gran variabilidad tanto en condiciones basales como en respuesta a CXCL12, lo cual ha sido asimismo observada en análisis de los coeficientes de difusión de $\alpha L\beta 2$ en presencia de PMA, o tras exposición a inhibidores de calpaína o a lovastatina³³⁷. En contraposición con todos estos datos, trabajos anteriores han propuesto que la estimulación transitoria de $\alpha L\beta 2$ con CXCL12 en linfocitos primarios de ratón bajo estrés fisiológico conlleva la adquisición de conformaciones de alta afinidad de esta integrina que implican un aumento rápido de su movilidad lateral³⁴⁰.

La disminución de la difusión de integrinas $\beta 1$ tras estimulación de las células T con CXCL12 podría ser debido a un aumento en la asociación de moléculas $\beta 1$ con talina o kindlin-3, lo que provocaría el anclaje de estas integrinas al citoesqueleto de actina^{188,341,342}. Se ha demostrado que la movilidad lateral de los receptores de membrana, incluyendo las integrinas, está a menudo regulada por interacciones con componentes asociados al citoesqueleto de actina^{47,343-345}. Así, se ha observado que dicho citoesqueleto regula la difusión de *nanoclusters* de $\alpha L\beta 2$ a concentraciones bajas de calcio. Adicionalmente, se ha sugerido que el

anclaje al citoesqueleto podría ser la clave para ejercer fuerzas que conlleven la activación de las integrinas al interaccionar con sus ligandos³⁴⁶.

Otra posibilidad no excluyente con la anterior, consistiría en que el decrecimiento de la movilidad de moléculas de $\beta 1$ individuales tras estimular con CXCL12 podría estar relacionado con la formación de *clusters* que restringirían su difusión. Así, diferentes estudios han mostrado que la movilidad de $\alpha L\beta 2$ no sólo está asociada con la adquisición de conformaciones de alta afinidad, sino también a su capacidad para formar *microclusters*^{336,347,348}. Nuestros análisis de las imágenes de inmunofluorescencia tomadas mediante microscopía de super-resolución STED no permitieron discriminar diferencias en el tamaño de los *clusters* de integrinas $\beta 1$ activas tras diferentes estímulos. Por tanto, esta técnica sigue estando limitada por su resolución (120 nm), siendo imposible diferenciar pequeños *clusters* moleculares de aquellos que contengan más moléculas. El estudio de la intensidad de fluorescencia de dichas imágenes reveló que tras estimular con CXCL12/VCAM-1 una parte de los *spots* fluorescentes adquirirían más intensidad de fluorescencia, indicando que estarían formados por un mayor número de integrinas $\alpha 4\beta 1$ activas. Estas observaciones correlacionaban directamente con una disminución de las distancias mínimas entre moléculas activas de $\alpha 4\beta 1$ tras la incubación con CXCL12/VCAM-1. Esto estaría en línea con los resultados de los experimentos de microscopía confocal, los cuales mostraban un aumento de la intensidad de fluorescencia en presencia de dichos estímulos. Por tanto, estos datos muestran una tendencia a la presencia de un mayor número de moléculas $\alpha 4\beta 1$ en su conformación activa tras exposición a CXCL12/VCAM-1, lo cual conlleva una disminución en la distancia entre los *spots* fluorescentes.

En conclusión, nuestros datos sugieren el siguiente modelo de la regulación de la movilidad de $\alpha 4\beta 1$ mostrado en la **Figura 60**. En condiciones basales, las moléculas de $\alpha 4\beta 1$ estarían mayoritariamente inactivas, presentando movilidad en la membrana celular, con una pequeña fracción molecular en forma activa e inmóvil. Esta pequeña fracción de moléculas estacionarias podría servir de puntos de anclaje para que otras moléculas de $\alpha 4\beta 1$ redujeran su difusión, facilitando el *clustering*. Tras estimulación con CXCL12, se produciría el aumento de la población estacionaria asociada a la activación de estas integrinas, y por tanto $\alpha 4\beta 1$ en su conformación activa tendrían menos movilidad y una tendencia a permanecer

confinada en determinados lugares de la membrana, posiblemente formando pequeños *clusters*. Cabe asimismo la posibilidad de que se encontraran formando *clusters* incluso con otras integrinas como $\alpha\text{L}\beta 2$, en los que podrían existir fenómenos de *cross-talk* entre ellas³⁴⁹. Será importante realizar en el futuro ensayos de *Single Particle Tracking* con inhibidores de polimerización de actina, como la citocalasina D, en presencia de ligando y/o quimioquina, con el objetivo de comprobar si dichos estímulos extracelulares están acoplados a señales intracelulares que afectan al citoesqueleto de actina.

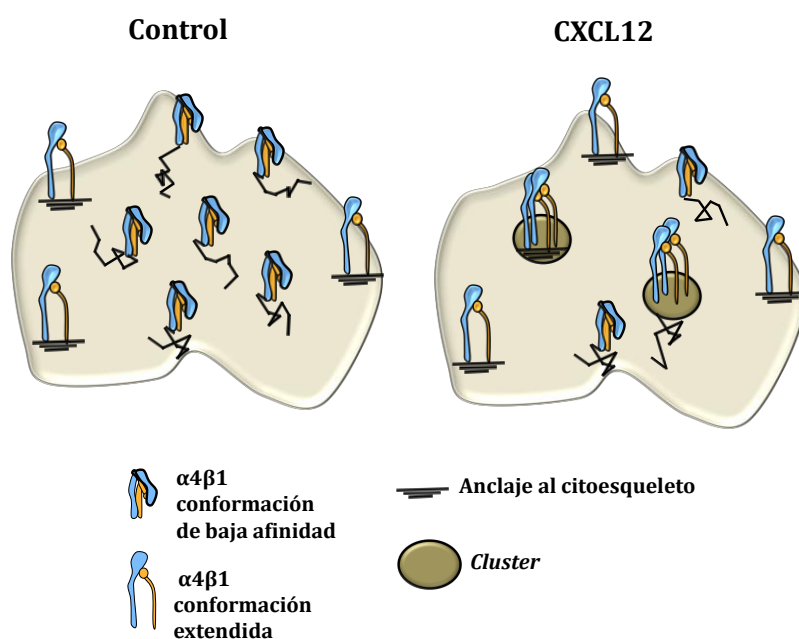


Figura 60. Modelo de movilidad de las integrinas $\beta 1$. En condiciones estándar la mayor parte de las integrinas $\beta 1$ se encuentra en su conformación de baja afinidad. Después de la estimulación con CXCL12 las integrinas $\beta 1$ adquieren la conformación extendida y ven reducida su difusión en membrana mostrando un aumento de la subpoblación inmóvil. Asimismo, una pequeña fracción de ellas se agrupa para forman pequeños *nanoclusters*.

Conclusiones

- CXCL12 estimula la asociación de SLP-76 con Vav1 y ADAP de una forma transitoria y rápida.
- SLP-76 y ADAP regulan positivamente la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4\beta 1$ en respuesta a quimioquinas.
- ADAP regula el reforzamiento de la adhesión y el *spreading* de linfocitos T sobre VCAM-1 en respuesta a quimioquinas, mientras SLP-76 contribuye especialmente al *spreading*.
- La actividad estimulatoria de ADAP e inhibitorias de Pyk2 durante la adhesión mediada por $\alpha 4\beta 1$ podrían estar conectadas a través de Rac1.
- SLP-76 contribuye a una óptima fosforilación de Vav1 estimulada por CXCL12 en linfocitos T.
- SKAP-1 es requerida durante las primeras etapas de la adhesión de células T dependiente de $\alpha 4\beta 1$ estimulada por quimioquinas, así como en el reforzamiento de dicha adhesión.
- SKAP-1 se comporta como un regulador negativo de la activación de las GTPasas RhoA y Rac, afectando así a la motilidad celular.
- SLP-76, ADAP y SKAP-1 no regulan la avidéz de $\alpha 4\beta 1$.
- ICAP-1 regula negativamente la afinidad de $\alpha 4\beta 1$, así como las primeras etapas de la adhesión linfocitaria dependiente de dicha integrina.
- La difusión de las integrinas $\beta 1$ se reduce significativamente tras estimular con CXCL12, mostrándose un decrecimiento en la población móvil y, por tanto, un incremento en la población estacionaria.
- Las integrinas $\alpha 4\beta 1$ adquieren su conformación activa tras los estímulos solubles con CXCL12, VCAM-1 o VCAM-1/CXCL12, observándose asimismo una disminución de la distancia entre *clusters*.

Bibliografía

- 1 Butcher, E. C., Williams, M., Youngman, K., Rott, L. & Briskin, M. Lymphocyte trafficking and regional immunity. *Advances in immunology* **72**, 209-253 (1999).
- 2 Butcher, E. C. & Picker, L. J. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* **272**, 60-66 (1996).
- 3 Springer, T. A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**, 301-314 (1994).
- 4 Baaten, B. J., Cooper, A. M., Swain, S. L. & Bradley, L. M. Location, location, location: the impact of migratory heterogeneity on T cell function. *Frontiers in immunology* **4**, 311, doi:10.3389/fimmu.2013.00311 (2013).
- 5 Miyasaka, M. & Tanaka, T. Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. *Nature reviews. Immunology* **4**, 360-370, doi:10.1038/nri1354 (2004).
- 6 Tufail, S., Badrealam, K. F., Sherwani, A., Gupta, U. D. & Owais, M. Tissue specific heterogeneity in effector immune cell response. *Frontiers in immunology* **4**, 254, doi:10.3389/fimmu.2013.00254 (2013).
- 7 Alon, R. & Ley, K. Cells on the run: shear-regulated integrin activation in leukocyte rolling and arrest on endothelial cells. *Current opinion in cell biology* **20**, 525-532, doi:10.1016/j.ceb.2008.04.003 (2008).
- 8 Alon, R. & Feigelson, S. From rolling to arrest on blood vessels: leukocyte tap dancing on endothelial integrin ligands and chemokines at sub-second contacts. *Seminars in immunology* **14**, 93-104, doi:10.1006/smim.2001.0346 (2002).
- 9 Laudanna, C. & Alon, R. Right on the spot. Chemokine triggering of integrin-mediated arrest of rolling leukocytes. *Thrombosis and Haemostasis*, doi:10.1160/th05-07-0482 (2005).
- 10 Johnston, B. & Butcher, E. C. Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggering and migration. *Seminars in immunology* **14**, 83-92, doi:10.1006/smim.2001.0345 (2002).
- 11 Chavakis, E., Choi, E. Y. & Chavakis, T. Novel aspects in the regulation of the leukocyte adhesion cascade. *Thromb Haemost* **102**, 191-197, doi:10.1160/TH08-12-0844 (2009).
- 12 McEver, R. P. Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. *Current opinion in cell biology* **14**, 581-586 (2002).
- 13 Rosen, S. D. Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annual review of immunology* **22**, 129-156, doi:10.1146/annurev.immunol.21.090501.080131 (2004).
- 14 Grabovsky, V. *et al.* Subsecond induction of alpha4 integrin clustering by immobilized chemokines stimulates leukocyte tethering and rolling on endothelial vascular cell adhesion molecule 1 under flow conditions. *The Journal of experimental medicine* **192**, 495-506 (2000).
- 15 Johnson, Z., Proudfoot, A. E. & Handel, T. M. Interaction of chemokines and glycosaminoglycans: a new twist in the regulation of chemokine function with opportunities for therapeutic intervention. *Cytokine & growth factor reviews* **16**, 625-636, doi:10.1016/j.cytogfr.2005.04.006 (2005).

- 16 Middleton, J., Patterson, A. M., Gardner, L., Schmutz, C. & Ashton, B. A. Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood* **100**, 3853-3860, doi:10.1182/blood.V100.12.3853 (2002).
- 17 Campbell, J. J. *et al.* Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* **279**, 381-384 (1998).
- 18 Gunn, M. D. *et al.* A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 258-263 (1998).
- 19 Huttenlocher, A. & Horwitz, A. R. Integrins in cell migration. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **3**, a005074, doi:10.1101/cshperspect.a005074 (2011).
- 20 Hynes, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673-687 (2002).
- 21 Bamias, G., Clark, D. J. & Rivera-Nieves, J. Leukocyte traffic blockade as a therapeutic strategy in inflammatory bowel disease. *Current drug targets* **14**, 1490-1500 (2013).
- 22 Springer, T. A. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annual review of physiology* **57**, 827-872, doi:10.1146/annurev.ph.57.030195.004143 (1995).
- 23 von Andrian, U. H. & Mackay, C. R. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *The New England journal of medicine* **343**, 1020-1034, doi:10.1056/NEJM200010053431407 (2000).
- 24 Kinashi, T. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nature reviews. Immunology* **5**, 546-559, doi:10.1038/nri1646 (2005).
- 25 Zarbock, A., Kempf, T., Wollert, K. C. & Vestweber, D. Leukocyte integrin activation and deactivation: novel mechanisms of balancing inflammation. *Journal of molecular medicine* **90**, 353-359, doi:10.1007/s00109-011-0835-2 (2012).
- 26 Carman, C. V. & Springer, T. A. A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *The Journal of cell biology* **167**, 377-388, doi:10.1083/jcb.200404129 (2004).
- 27 Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I. & Nourshargh, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature reviews. Immunology* **7**, 678-689, doi:10.1038/nri2156 (2007).
- 28 Vestweber, D., Wessel, F. & Nottebaum, A. F. Similarities and differences in the regulation of leukocyte extravasation and vascular permeability. *Seminars in immunopathology* **36**, 177-192, doi:10.1007/s00281-014-0419-7 (2014).
- 29 Humphries, M. J. Integrin cell adhesion receptors and the concept of agonism. *Trends in pharmacological sciences* **21**, 29-32 (2000).
- 30 van Buul, J. D., Kanters, E. & Hordijk, P. L. Endothelial signaling by Ig-like cell adhesion molecules. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **27**, 1870-1876, doi:10.1161/ATVBAHA.107.145821 (2007).
- 31 Kinashi, T. Integrin regulation of lymphocyte trafficking: lessons from structural and signaling studies. *Advances in immunology* **93**, 185-227, doi:10.1016/S0065-2776(06)93005-3 (2007).

- 32 Moser, M., Legate, K. R., Zent, R. & Fassler, R. The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science* **324**, 895-899, doi:10.1126/science.1163865 (2009).
- 33 Dickeson, S. K. & Santoro, S. A. Ligand recognition by the I domain-containing integrins. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **54**, 556-566 (1998).
- 34 Springer, T. A. & Wang, J. H. The three-dimensional structure of integrins and their ligands, and conformational regulation of cell adhesion. *Advances in protein chemistry* **68**, 29-63, doi:10.1016/S0065-3233(04)68002-8 (2004).
- 35 Calderwood, D. A., Campbell, I. D. & Critchley, D. R. Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion. *Nature reviews. Molecular cell biology* **14**, 503-517, doi:10.1038/nrm3624 (2013).
- 36 Springer, T. A. & Dustin, M. L. Integrin inside-out signaling and the immunological synapse. *Current opinion in cell biology* **24**, 107-115, doi:10.1016/j.ceb.2011.10.004 (2012).
- 37 Calderwood, D. A. *et al.* Integrin beta cytoplasmic domain interactions with phosphotyrosine-binding domains: a structural prototype for diversity in integrin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 2272-2277, doi:10.1073/pnas.262791999 (2003).
- 38 Calderwood, D. A. & Ginsberg, M. H. Talin forges the links between integrins and actin. *Nature cell biology* **5**, 694-697, doi:10.1038/ncb0803-694 (2003).
- 39 Cadierno, V. *et al.* Ruthenium(II) and ruthenium(IV) complexes containing kappa1-P-, kappa2-P,O-, and kappa3-P,N,O-iminophosphorane-phosphine ligands Ph₂PCH₂P[=NP(=O)(OR)₂]Ph₂ (R = Et, Ph): synthesis, reactivity, theoretical studies, and catalytic activity in transfer hydrogenation of cyclohexanone. *Inorganic chemistry* **42**, 3293-3307, doi:10.1021/ic020702k (2003).
- 40 Shattil, S. J., Kim, C. & Ginsberg, M. H. The final steps of integrin activation: the end game. *Nature reviews. Molecular cell biology* **11**, 288-300, doi:10.1038/nrm2871 (2010).
- 41 Takagi, J. & Springer, T. A. Integrin activation and structural rearrangement. *Immunological reviews* **186**, 141-163 (2002).
- 42 Carman, C. V. & Springer, T. A. Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Current opinion in cell biology* **15**, 547-556, doi:10.1016/j.ceb.2003.08.003 (2003).
- 43 Luo, B. H., Carman, C. V. & Springer, T. A. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annual review of immunology* **25**, 619-647, doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141618 (2007).
- 44 Arnaout, M. A., Goodman, S. L. & Xiong, J. P. Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. *Current opinion in cell biology* **19**, 495-507, doi:10.1016/j.ceb.2007.08.002 (2007).
- 45 Arnaout, M. A. Integrin structure: new twists and turns in dynamic cell adhesion. *Immunological reviews* **186**, 125-140 (2002).
- 46 Ratnikov, B. *et al.* Talin phosphorylation sites mapped by mass spectrometry. *Journal of cell science* **118**, 4921-4923, doi:10.1242/jcs.02682 (2005).
- 47 Liu, S., Calderwood, D. A. & Ginsberg, M. H. Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *Journal of cell science* **113 (Pt 20)**, 3563-3571 (2000).

- 48 Pfaff, M., Liu, S., Erle, D. J. & Ginsberg, M. H. Integrin beta cytoplasmic domains differentially bind to cytoskeletal proteins. *The Journal of biological chemistry* **273**, 6104-6109 (1998).
- 49 Kim, M., Carman, C. V., Yang, W., Salas, A. & Springer, T. A. The primacy of affinity over clustering in regulation of adhesiveness of the integrin {alpha}L{beta}2. *The Journal of cell biology* **167**, 1241-1253, doi:10.1083/jcb.200404160 (2004).
- 50 Humphries, M. J. Monoclonal antibodies as probes of integrin priming and activation. *Biochemical Society transactions* **32**, 407-411, doi:10.1042/BST0320407 (2004).
- 51 Zhang, Y. & Wang, H. Integrin signalling and function in immune cells. *Immunology* **135**, 268-275, doi:10.1111/j.1365-2567.2011.03549.x (2012).
- 52 Ginsberg, M. H., Partridge, A. & Shattil, S. J. Integrin regulation. *Current opinion in cell biology* **17**, 509-516, doi:10.1016/j.ceb.2005.08.010 (2005).
- 53 Garcia-Alvarez, B. *et al.* Structural determinants of integrin recognition by talin. *Molecular cell* **11**, 49-58 (2003).
- 54 Calderwood, D. A., Shattil, S. J. & Ginsberg, M. H. Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. *The Journal of biological chemistry* **275**, 22607-22610, doi:10.1074/jbc.R900037199 (2000).
- 55 Campbell, I. D. & Ginsberg, M. H. The talin-tail interaction places integrin activation on FERM ground. *Trends in biochemical sciences* **29**, 429-435, doi:10.1016/j.tibs.2004.06.005 (2004).
- 56 Priddle, H. *et al.* Disruption of the talin gene compromises focal adhesion assembly in undifferentiated but not differentiated embryonic stem cells. *The Journal of cell biology* **142**, 1121-1133 (1998).
- 57 Nieswandt, B. *et al.* Loss of talin1 in platelets abrogates integrin activation, platelet aggregation, and thrombus formation in vitro and in vivo. *The Journal of experimental medicine* **204**, 3113-3118, doi:10.1084/jem.20071827 (2007).
- 58 Petrich, B. G. *et al.* Talin is required for integrin-mediated platelet function in hemostasis and thrombosis. *The Journal of experimental medicine* **204**, 3103-3111, doi:10.1084/jem.20071800 (2007).
- 59 Monkley, S. J. *et al.* Endothelial cell talin1 is essential for embryonic angiogenesis. *Developmental biology* **349**, 494-502, doi:10.1016/j.ydbio.2010.11.010 (2011).
- 60 Monkley, S. J., Pritchard, C. A. & Critchley, D. R. Analysis of the mammalian talin2 gene TLN2. *Biochemical and biophysical research communications* **286**, 880-885, doi:10.1006/bbrc.2001.5497 (2001).
- 61 Conti, F. J., Monkley, S. J., Wood, M. R., Critchley, D. R. & Muller, U. Talin 1 and 2 are required for myoblast fusion, sarcomere assembly and the maintenance of myotendinous junctions. *Development* **136**, 3597-3606, doi:10.1242/dev.035857 (2009).
- 62 Rodius, S. *et al.* The talin rod IBS2 alpha-helix interacts with the beta3 integrin cytoplasmic tail membrane-proximal helix by establishing charge complementary salt bridges. *The Journal of biological chemistry* **283**, 24212-24223, doi:10.1074/jbc.M709704200 (2008).

- 63 Anthis, N. J. *et al.* The structure of an integrin/talin complex reveals the basis of inside-out signal transduction. *The EMBO journal* **28**, 3623-3632, doi:10.1038/emboj.2009.287 (2009).
- 64 Imai, Y. *et al.* Genetic perturbation of the putative cytoplasmic membrane-proximal salt bridge aberrantly activates alpha(4) integrins. *Blood* **112**, 5007-5015, doi:10.1182/blood-2008-03-144543 (2008).
- 65 Anthis, N. J. & Campbell, I. D. The tail of integrin activation. *Trends in biochemical sciences* **36**, 191-198, doi:10.1016/j.tibs.2010.11.002 (2011).
- 66 Ye, F., Snider, A. K. & Ginsberg, M. H. Talin and kindlin: the one-two punch in integrin activation. *Frontiers of medicine* **8**, 6-16, doi:10.1007/s11684-014-0317-3 (2014).
- 67 Goksoy, E. *et al.* Structural basis for the autoinhibition of talin in regulating integrin activation. *Molecular cell* **31**, 124-133, doi:10.1016/j.molcel.2008.06.011 (2008).
- 68 Yang, J. *et al.* Conformational activation of talin by RIAM triggers integrin-mediated cell adhesion. *Nature communications* **5**, 5880, doi:10.1038/ncomms6880 (2014).
- 69 Chang, Y. C. *et al.* Structural and mechanistic insights into the recruitment of talin by RIAM in integrin signaling. *Structure* **22**, 1810-1820, doi:10.1016/j.str.2014.09.020 (2014).
- 70 Moser, M. *et al.* Kindlin-3 is required for beta2 integrin-mediated leukocyte adhesion to endothelial cells. *Nature medicine* **15**, 300-305, doi:10.1038/nm.1921 (2009).
- 71 Alon, R. Chemokine arrest signals to leukocyte integrins trigger bi-directional-occupancy of individual heterodimers by extracellular and cytoplasmic ligands. *Cell adhesion & migration* **4**, 211-214 (2010).
- 72 Takala, H. *et al.* Beta2 integrin phosphorylation on Thr758 acts as a molecular switch to regulate 14-3-3 and filamin binding. *Blood* **112**, 1853-1862, doi:10.1182/blood-2007-12-127795 (2008).
- 73 Appelblom, H. *et al.* Homogeneous TR-FRET high-throughput screening assay for calcium-dependent multimerization of sorcin. *Journal of biomolecular screening* **12**, 842-848, doi:10.1177/1087057107303973 (2007).
- 74 Bottcher, R. T. *et al.* Sorting nexin 17 prevents lysosomal degradation of beta1 integrins by binding to the beta1-integrin tail. *Nature cell biology* **14**, 584-592, doi:10.1038/ncb2501 (2012).
- 75 Siegel, D. H. *et al.* Loss of kindlin-1, a human homolog of the *Caenorhabditis elegans* actin-extracellular-matrix linker protein UNC-112, causes Kindler syndrome. *American journal of human genetics* **73**, 174-187, doi:10.1086/376609 (2003).
- 76 Ali, R. H. & Khan, A. A. Tracing the evolution of FERM domain of Kindlins. *Molecular phylogenetics and evolution* **80**, 193-204, doi:10.1016/j.ympev.2014.08.008 (2014).
- 77 Ussar, S., Wang, H. V., Linder, S., Fassler, R. & Moser, M. The Kindlins: subcellular localization and expression during murine development. *Experimental cell research* **312**, 3142-3151, doi:10.1016/j.yexcr.2006.06.030 (2006).
- 78 Bialkowska, K. *et al.* The integrin co-activator Kindlin-3 is expressed and functional in a non-hematopoietic cell, the endothelial cell. *The Journal of*

- biological chemistry* **285**, 18640-18649, doi:10.1074/jbc.M109.085746 (2010).
- 79 Morrison, V. L. *et al.* The beta2 integrin-kindlin-3 interaction is essential for T-cell homing but dispensable for T-cell activation in vivo. *Blood* **122**, 1428-1436, doi:10.1182/blood-2013-02-484998 (2013).
- 80 Cohen, S. J. *et al.* The integrin coactivator Kindlin-3 is not required for lymphocyte diapedesis. *Blood* **122**, 2609-2617, doi:10.1182/blood-2013-04-495036 (2013).
- 81 Moretti, F. A. *et al.* Kindlin-3 regulates integrin activation and adhesion reinforcement of effector T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 17005-17010, doi:10.1073/pnas.1316032110 (2013).
- 82 Fagerholm, S. C., Lek, H. S. & Morrison, V. L. Kindlin-3 in the immune system. *American journal of clinical and experimental immunology* **3**, 37-42 (2014).
- 83 Bouvard, D., Pouwels, J., De Franceschi, N. & Ivaska, J. Integrin inactivators: balancing cellular functions in vitro and in vivo. *Nature reviews. Molecular cell biology* **14**, 430-442, doi:10.1038/nrm3599 (2013).
- 84 Brunner, M. *et al.* Osteoblast mineralization requires beta1 integrin/ICAP-1-dependent fibronectin deposition. *The Journal of cell biology* **194**, 307-322, doi:10.1083/jcb.201007108 (2011).
- 85 Bouvard, D. *et al.* Defective osteoblast function in ICAP-1-deficient mice. *Development* **134**, 2615-2625, doi:10.1242/dev.000877 (2007).
- 86 Bouvard, D. *et al.* Disruption of focal adhesions by integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 alpha. *The Journal of biological chemistry* **278**, 6567-6574, doi:10.1074/jbc.M211258200 (2003).
- 87 Chang, D. D., Wong, C., Smith, H. & Liu, J. ICAP-1, a novel beta1 integrin cytoplasmic domain-associated protein, binds to a conserved and functionally important NPXY sequence motif of beta1 integrin. *The Journal of cell biology* **138**, 1149-1157 (1997).
- 88 Degani, S. *et al.* The integrin cytoplasmic domain-associated protein ICAP-1 binds and regulates Rho family GTPases during cell spreading. *The Journal of cell biology* **156**, 377-387, doi:10.1083/jcb.200108030 (2002).
- 89 Zheng, Y., Qiu, J., Hu, J. & Wang, G. Concepts and hypothesis: integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 (ICAP-1) as a potential player in cerebral cavernous malformation. *Journal of neurology* **260**, 10-19, doi:10.1007/s00415-012-6567-6 (2013).
- 90 Bouvard, D., Millon-Fremillon, A., Dupe-Manet, S., Block, M. R. & Albiges-Rizo, C. Unraveling ICAP-1 function: toward a new direction? *European journal of cell biology* **85**, 275-282, doi:10.1016/j.ejcb.2005.10.005 (2006).
- 91 Cukrowicz, K. C. *et al.* Suicide ideation among college students evidencing subclinical depression. *Journal of American college health : J of ACH* **59**, 575-581, doi:10.1080/07448481.2010.483710 (2011).
- 92 Liu, W. & Boggon, T. J. Cocystal structure of the ICAP1 PTB domain in complex with a KRIT1 peptide. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications* **69**, 494-498, doi:10.1107/S1744309113010762 (2013).
- 93 Liu, W., Draheim, K. M., Zhang, R., Calderwood, D. A. & Boggon, T. J. Mechanism for KRIT1 release of ICAP1-mediated suppression of integrin

- activation. *Molecular cell* **49**, 719-729, doi:10.1016/j.molcel.2012.12.005 (2013).
- 94 Zhang, J., Clatterbuck, R. E., Rigamonti, D., Chang, D. D. & Dietz, H. C. Interaction between krit1 and icap1alpha infers perturbation of integrin beta1-mediated angiogenesis in the pathogenesis of cerebral cavernous malformation. *Human molecular genetics* **10**, 2953-2960 (2001).
- 95 Kim, J., Sherman, N. E., Fox, J. W. & Ginsberg, M. H. Phosphorylation sites in the cerebral cavernous malformations complex. *Journal of cell science* **124**, 3929-3932, doi:10.1242/jcs.095471 (2011).
- 96 Millon-Fremillon, A. *et al.* Calcium and calmodulin-dependent serine/threonine protein kinase type II (CaMKII)-mediated intramolecular opening of integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 (ICAP-1alpha) negatively regulates beta1 integrins. *The Journal of biological chemistry* **288**, 20248-20260, doi:10.1074/jbc.M113.455956 (2013).
- 97 Fournier, H. N. *et al.* Nuclear translocation of integrin cytoplasmic domain-associated protein 1 stimulates cellular proliferation. *Molecular biology of the cell* **16**, 1859-1871, doi:10.1091/mbc.E04-08-0744 (2005).
- 98 Postel, E. H., Berberich, S. J., Flint, S. J. & Ferrone, C. A. Human c-myc transcription factor PuF identified as nm23-H2 nucleoside diphosphate kinase, a candidate suppressor of tumor metastasis. *Science* **261**, 478-480 (1993).
- 99 Zawistowski, J. S. *et al.* CCM1 and CCM2 protein interactions in cell signaling: implications for cerebral cavernous malformations pathogenesis. *Human molecular genetics* **14**, 2521-2531, doi:10.1093/hmg/ddi256 (2005).
- 100 Rose, D. M., Han, J. & Ginsberg, M. H. Alpha4 integrins and the immune response. *Immunological reviews* **186**, 118-124 (2002).
- 101 Rose, D. M., Alon, R. & Ginsberg, M. H. Integrin modulation and signaling in leukocyte adhesion and migration. *Immunological reviews* **218**, 126-134, doi:10.1111/j.1600-065X.2007.00536.x (2007).
- 102 Teixido, J., Hemler, M. E., Greenberger, J. S. & Anklesaria, P. Role of beta 1 and beta 2 integrins in the adhesion of human CD34hi stem cells to bone marrow stroma. *The Journal of clinical investigation* **90**, 358-367, doi:10.1172/JCI115870 (1992).
- 103 Arroyo, A. G., Yang, J. T., Rayburn, H. & Hynes, R. O. Differential requirements for alpha4 integrins during fetal and adult hematopoiesis. *Cell* **85**, 997-1008 (1996).
- 104 Scott, L. M., Priestley, G. V. & Papayannopoulou, T. Deletion of 4 Integrins from Adult Hematopoietic Cells Reveals Roles in Homeostasis, Regeneration, and Homing. *Molecular and Cellular Biology* **23**, 9349-9360, doi:10.1128/mcb.23.24.9349-9360.2003 (2003).
- 105 Lobb, R. R. & Hemler, M. E. The pathophysiologic role of alpha 4 integrins in vivo. *The Journal of clinical investigation* **94**, 1722-1728, doi:10.1172/JCI117519 (1994).
- 106 Kirby, M. L. & Hutson, M. R. Factors controlling cardiac neural crest cell migration. *Cell adhesion & migration* **4**, 609-621 (2010).
- 107 Tucker, R. P. Neural crest cells: a model for invasive behavior. *The international journal of biochemistry & cell biology* **36**, 173-177 (2004).

- 108 Johnson, J. P. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer metastasis reviews* **18**, 345-357 (1999).
- 109 Makarem, R. *et al.* Competitive binding of vascular cell adhesion molecule-1 and the HepII/IIICS domain of fibronectin to the integrin alpha 4 beta 1. *The Journal of biological chemistry* **269**, 4005-4011 (1994).
- 110 Garcia-Bernal, D. *et al.* Sphingosine-1-phosphate activates chemokine-promoted myeloma cell adhesion and migration involving alpha4beta1 integrin function. *The Journal of pathology* **229**, 36-48, doi:10.1002/path.4066 (2013).
- 111 Uchiyama, H., Barut, B. A., Chauhan, D., Cannistra, S. A. & Anderson, K. C. Characterization of adhesion molecules on human myeloma cell lines. *Blood* **80**, 2306-2314 (1992).
- 112 Sanz-Rodriguez, F., Ruiz-Velasco, N., Pascual-Salcedo, D. & Teixido, J. Characterization of VLA-4-dependent myeloma cell adhesion to fibronectin and VCAM-1. *British journal of haematology* **107**, 825-834 (1999).
- 113 Damiano, J. S., Cress, A. E., Hazlehurst, L. A., Shtil, A. A. & Dalton, W. S. Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood* **93**, 1658-1667 (1999).
- 114 Nuckel, H. *et al.* FCRL2 mRNA expression is inversely associated with clinical progression in chronic lymphocytic leukemia. *European journal of haematology* **83**, 541-549, doi:10.1111/j.1600-0609.2009.01328.x (2009).
- 115 Ugarte-Berzal, E. *et al.* A 17-residue sequence from the matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) hemopexin domain binds alpha4beta1 integrin and inhibits MMP-9-induced functions in chronic lymphocytic leukemia B cells. *The Journal of biological chemistry* **287**, 27601-27613, doi:10.1074/jbc.M112.354670 (2012).
- 116 Redondo-Munoz, J. *et al.* MMP-9 in B-cell chronic lymphocytic leukemia is up-regulated by alpha4beta1 integrin or CXCR4 engagement via distinct signaling pathways, localizes to podosomes, and is involved in cell invasion and migration. *Blood* **108**, 3143-3151, doi:10.1182/blood-2006-03-007294 (2006).
- 117 Verfaillie, C. M., McCarthy, J. B. & McGlave, P. B. Mechanisms underlying abnormal trafficking of malignant progenitors in chronic myelogenous leukemia. Decreased adhesion to stroma and fibronectin but increased adhesion to the basement membrane components laminin and collagen type IV. *The Journal of clinical investigation* **90**, 1232-1241, doi:10.1172/JCI115985 (1992).
- 118 Osborn, L. *et al.* Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* **59**, 1203-1211 (1989).
- 119 Jacobsen, K., Kravitz, J., Kincade, P. W. & Osmond, D. G. Adhesion receptors on bone marrow stromal cells: in vivo expression of vascular cell adhesion molecule-1 by reticular cells and sinusoidal endothelium in normal and gamma-irradiated mice. *Blood* **87**, 73-82 (1996).
- 120 Salomon, D. R. *et al.* Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed by cortical thymic epithelial cells and mediates thymocyte adhesion. Implications for the function of alpha4beta1 (VLA4) integrin in T-cell development. *Blood* **89**, 2461-2471 (1997).

- 121 Salomon, D. R. *et al.* Constitutive activation of integrin alpha 4 beta 1 defines a unique stage of human thymocyte development. *The Journal of experimental medicine* **179**, 1573-1584 (1994).
- 122 Sironi, M. *et al.* Regulation of endothelial and mesothelial cell function by interleukin-13: selective induction of vascular cell adhesion molecule-1 and amplification of interleukin-6 production. *Blood* **84**, 1913-1921 (1994).
- 123 Neish, A. S., Williams, A. J., Palmer, H. J., Whitley, M. Z. & Collins, T. Functional analysis of the human vascular cell adhesion molecule 1 promoter. *The Journal of experimental medicine* **176**, 1583-1593 (1992).
- 124 Swerlick, R. A. *et al.* Regulation of vascular cell adhesion molecule 1 on human dermal microvascular endothelial cells. *Journal of immunology* **149**, 698-705 (1992).
- 125 Polte, T., Newman, W. & Gopal, T. V. Full length vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1). *Nucleic acids research* **18**, 5901 (1990).
- 126 Baron, J. L., Madri, J. A., Ruddle, N. H., Hashim, G. & Janeway, C. A., Jr. Surface expression of alpha 4 integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma. *The Journal of experimental medicine* **177**, 57-68 (1993).
- 127 Carter, R. A. & Wicks, I. P. Vascular cell adhesion molecule 1 (CD106): a multifaceted regulator of joint inflammation. *Arthritis and rheumatism* **44**, 985-994, doi:10.1002/1529-0131(200105)44:5<985::AID-ANR176>3.0.CO;2-P (2001).
- 128 Chin, J. E. *et al.* Airway recruitment of leukocytes in mice is dependent on alpha4-integrins and vascular cell adhesion molecule-1. *The American journal of physiology* **272**, L219-229 (1997).
- 129 Iiyama, K. *et al.* Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circulation research* **85**, 199-207 (1999).
- 130 Koni, P. A. *et al.* Conditional vascular cell adhesion molecule 1 deletion in mice: impaired lymphocyte migration to bone marrow. *The Journal of experimental medicine* **193**, 741-754 (2001).
- 131 Sanchez-Aparicio, P., Dominguez-Jimenez, C. & Garcia-Pardo, A. Activation of the alpha 4 beta 1 integrin through the beta 1 subunit induces recognition of the RGDS sequence in fibronectin. *The Journal of cell biology* **126**, 271-279 (1994).
- 132 Garcia-Pardo, A., Wayner, E. A., Carter, W. G. & Ferreira, O. C., Jr. Human B lymphocytes define an alternative mechanism of adhesion to fibronectin. The interaction of the alpha 4 beta 1 integrin with the LHGPEILDVPST sequence of the type III connecting segment is sufficient to promote cell attachment. *Journal of immunology* **144**, 3361-3366 (1990).
- 133 Moyano, J. V. *et al.* Cooperative role for activated alpha4 beta1 integrin and chondroitin sulfate proteoglycans in cell adhesion to the heparin III domain of fibronectin. Identification of a novel heparin and cell binding sequence in repeat III5. *The Journal of biological chemistry* **274**, 135-142 (1999).
- 134 Gerard, C. & Rollins, B. J. Chemokines and disease. *Nature immunology* **2**, 108-115, doi:10.1038/84209 (2001).
- 135 Rossi, D. & Zlotnik, A. The biology of chemokines and their receptors. *Annual review of immunology* **18**, 217-242, doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.217 (2000).

- 136 Proudfoot, A. E. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nature reviews. Immunology* **2**, 106-115, doi:10.1038/nri722 (2002).
- 137 Ma, Q. *et al.* Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 9448-9453 (1998).
- 138 Belperio, J. A. *et al.* CXC chemokines in angiogenesis. *Journal of leukocyte biology* **68**, 1-8 (2000).
- 139 Robledo, M. M. *et al.* Expression of functional chemokine receptors CXCR3 and CXCR4 on human melanoma cells. *The Journal of biological chemistry* **276**, 45098-45105, doi:10.1074/jbc.M106912200 (2001).
- 140 Kim, M. *et al.* CXCR4 signaling regulates metastasis of chemoresistant melanoma cells by a lymphatic metastatic niche. *Cancer research* **70**, 10411-10421, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2591 (2010).
- 141 Moser, B. & Willmann, K. Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. *Annals of the rheumatic diseases* **63 Suppl 2**, ii84-ii89, doi:10.1136/ard.2004.028316 (2004).
- 142 Mellado, M., Rodriguez-Frade, J. M., Manes, S. & Martinez, A. C. Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation. *Annual review of immunology* **19**, 397-421, doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.397 (2001).
- 143 Sallusto, F., Lanzavecchia, A. & Mackay, C. R. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunology today* **19**, 568-574 (1998).
- 144 Hidalgo, A. *et al.* Chemokine stromal cell-derived factor-1alpha modulates VLA-4 integrin-dependent adhesion to fibronectin and VCAM-1 on bone marrow hematopoietic progenitor cells. *Experimental hematology* **29**, 345-355 (2001).
- 145 Peled, A. *et al.* The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow. *The Journal of clinical investigation* **104**, 1199-1211, doi:10.1172/JCI7615 (1999).
- 146 Bachelier, F. *et al.* New nomenclature for atypical chemokine receptors. *Nature immunology* **15**, 207-208, doi:10.1038/ni.2812 (2014).
- 147 Bacon, K. *et al.* Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* **22**, 1067-1068, doi:10.1089/107999002760624305 (2002).
- 148 Murphy, P. M. International Union of Pharmacology. XXX. Update on chemokine receptor nomenclature. *Pharmacological reviews* **54**, 227-229 (2002).
- 149 Zlotnik, A. & Yoshie, O. The chemokine superfamily revisited. *Immunity* **36**, 705-716, doi:10.1016/j.immuni.2012.05.008 (2012).
- 150 Zlotnik, A. & Yoshie, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* **12**, 121-127 (2000).
- 151 Allen, S. J., Crown, S. E. & Handel, T. M. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annual review of immunology* **25**, 787-820, doi:10.1146/annurev.immunol.24.021605.090529 (2007).
- 152 Mantovani, A. The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunology today* **20**, 254-257 (1999).

- 153 Moser, B. Chemokines: role in immune cell traffic. *European cytokine network* **14**, 204-210 (2003).
- 154 Nomiya, H., Osada, N. & Yoshie, O. Systematic classification of vertebrate chemokines based on conserved synteny and evolutionary history. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **18**, 1-16, doi:10.1111/gtc.12013 (2013).
- 155 Handel, T. M., Johnson, Z., Crown, S. E., Lau, E. K. & Proudfoot, A. E. Regulation of protein function by glycosaminoglycans--as exemplified by chemokines. *Annual review of biochemistry* **74**, 385-410, doi:10.1146/annurev.biochem.72.121801.161747 (2005).
- 156 Lau, E. K. *et al.* Identification of the glycosaminoglycan binding site of the CC chemokine, MCP-1: implications for structure and function in vivo. *The Journal of biological chemistry* **279**, 22294-22305, doi:10.1074/jbc.M311224200 (2004).
- 157 Verkaar, F. *et al.* Chemokine cooperativity is caused by competitive glycosaminoglycan binding. *Journal of immunology* **192**, 3908-3914, doi:10.4049/jimmunol.1302159 (2014).
- 158 Pierce, K. L., Premont, R. T. & Lefkowitz, R. J. Seven-transmembrane receptors. *Nature reviews. Molecular cell biology* **3**, 639-650, doi:10.1038/nrm908 (2002).
- 159 Murdoch, C. CXCR4: chemokine receptor extraordinaire. *Immunological reviews* **177**, 175-184 (2000).
- 160 Marinissen, M. J. & Gutkind, J. S. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends in pharmacological sciences* **22**, 368-376 (2001).
- 161 Luttrell, L. M. & Gesty-Palmer, D. Beyond desensitization: physiological relevance of arrestin-dependent signaling. *Pharmacological reviews* **62**, 305-330, doi:10.1124/pr.109.002436 (2010).
- 162 Ferguson, S. S. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacological reviews* **53**, 1-24 (2001).
- 163 Luster, A. D., Alon, R. & von Andrian, U. H. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nature immunology* **6**, 1182-1190, doi:10.1038/ni1275 (2005).
- 164 Crump, M. P. *et al.* Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *The EMBO journal* **16**, 6996-7007, doi:10.1093/emboj/16.23.6996 (1997).
- 165 Bleul, C. C., Fuhlbrigge, R. C., Casasnovas, J. M., Aiuti, A. & Springer, T. A. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *The Journal of experimental medicine* **184**, 1101-1109 (1996).
- 166 Shirozu, M. *et al.* Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* **28**, 495-500, doi:10.1006/geno.1995.1180 (1995).
- 167 Yu, L. *et al.* Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1. *Gene* **374**, 174-179, doi:10.1016/j.gene.2006.02.001 (2006).
- 168 Altenburg, J. D. *et al.* A naturally occurring splice variant of CXCL12/stromal cell-derived factor 1 is a potent human immunodeficiency virus type 1

- inhibitor with weak chemotaxis and cell survival activities. *Journal of virology* **81**, 8140-8148, doi:10.1128/JVI.00268-07 (2007).
- 169 Veldkamp, C. T., Peterson, F. C., Pelzek, A. J. & Volkman, B. F. The monomer-dimer equilibrium of stromal cell-derived factor-1 (CXCL 12) is altered by pH, phosphate, sulfate, and heparin. *Protein science : a publication of the Protein Society* **14**, 1071-1081, doi:10.1110/ps.041219505 (2005).
- 170 Fiorina, P. *et al.* Targeting the CXCR4-CXCL12 axis mobilizes autologous hematopoietic stem cells and prolongs islet allograft survival via programmed death ligand 1. *Journal of immunology* **186**, 121-131, doi:10.4049/jimmunol.1000799 (2011).
- 171 Dealwis, C. *et al.* Crystal structure of chemically synthesized [N33A] stromal cell-derived factor 1alpha, a potent ligand for the HIV-1 "fusin" coreceptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 6941-6946 (1998).
- 172 Wright, N. *et al.* Transforming growth factor-beta1 down-regulates expression of chemokine stromal cell-derived factor-1: functional consequences in cell migration and adhesion. *Blood* **102**, 1978-1984, doi:10.1182/blood-2002-10-3190 (2003).
- 173 Ueda, Y., Yang, K., Foster, S. J., Kondo, M. & Kelsoe, G. Inflammation controls B lymphopoiesis by regulating chemokine CXCL12 expression. *The Journal of experimental medicine* **199**, 47-58, doi:10.1084/jem.20031104 (2004).
- 174 Petit, I. *et al.* G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nature immunology* **3**, 687-694, doi:10.1038/ni813 (2002).
- 175 Ponomaryov, T. *et al.* Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *The Journal of clinical investigation* **106**, 1331-1339, doi:10.1172/JCI10329 (2000).
- 176 Gupta, S. K., Lysko, P. G., Pillarisetti, K., Ohlstein, E. & Stadel, J. M. Chemokine receptors in human endothelial cells. Functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines. *The Journal of biological chemistry* **273**, 4282-4287 (1998).
- 177 Arnolds, K. L. & Spencer, J. V. CXCR4: a virus's best friend? *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **25**, 146-156, doi:10.1016/j.meegid.2014.04.018 (2014).
- 178 Xu, T. P., Shen, H., Liu, L. X. & Shu, Y. Q. The impact of chemokine receptor CXCR4 on breast cancer prognosis: a meta-analysis. *Cancer epidemiology* **37**, 725-731, doi:10.1016/j.canep.2013.04.017 (2013).
- 179 Bartolome, R. A. *et al.* Stromal cell-derived factor-1alpha promotes melanoma cell invasion across basement membranes involving stimulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and Rho GTPase activities. *Cancer research* **64**, 2534-2543 (2004).
- 180 Zhang, Z. *et al.* Expression of CXCR4 and breast cancer prognosis: a systematic review and meta-analysis. *BMC cancer* **14**, 49, doi:10.1186/1471-2407-14-49 (2014).
- 181 Balkwill, F. Cancer and the chemokine network. *Nature reviews. Cancer* **4**, 540-550, doi:10.1038/nrc1388 (2004).

- 182 Epstein, R. J. The CXCL12-CXCR4 chemotactic pathway as a target of adjuvant breast cancer therapies. *Nature reviews. Cancer* **4**, 901-909, doi:10.1038/nrc1473 (2004).
- 183 Vila-Coro, A. J. *et al.* HIV-1 infection through the CCR5 receptor is blocked by receptor dimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 3388-3393, doi:10.1073/pnas.050457797 (2000).
- 184 Rodriguez-Frade, J. M. *et al.* Blocking HIV-1 infection via CCR5 and CXCR4 receptors by acting in trans on the CCR2 chemokine receptor. *The EMBO journal* **23**, 66-76, doi:10.1038/sj.emboj.7600020 (2004).
- 185 Ganju, R. K. *et al.* The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways. *The Journal of biological chemistry* **273**, 23169-23175 (1998).
- 186 Vicente-Manzanares, M. *et al.* Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in stromal cell-derived factor-1 alpha-induced lymphocyte polarization and chemotaxis. *Journal of immunology* **163**, 4001-4012 (1999).
- 187 Garcia-Bernal, D. *et al.* Vav1 and Rac control chemokine-promoted T lymphocyte adhesion mediated by the integrin alpha4beta1. *Molecular biology of the cell* **16**, 3223-3235, doi:10.1091/mbc.E04-12-1049 (2005).
- 188 Garcia-Bernal, D. *et al.* Chemokine-induced Zap70 kinase-mediated dissociation of the Vav1-talin complex activates alpha4beta1 integrin for T cell adhesion. *Immunity* **31**, 953-964, doi:10.1016/j.immuni.2009.09.021 (2009).
- 189 Vicente-Manzanares, M. *et al.* Control of lymphocyte shape and the chemotactic response by the GTP exchange factor Vav. *Blood* **105**, 3026-3034, doi:10.1182/blood-2004-07-2925 (2005).
- 190 Wright, N. *et al.* The chemokine stromal cell-derived factor-1 alpha modulates alpha 4 beta 7 integrin-mediated lymphocyte adhesion to mucosal addressin cell adhesion molecule-1 and fibronectin. *Journal of immunology* **168**, 5268-5277 (2002).
- 191 Nagasawa, T. *et al.* Molecular cloning and characterization of a murine pre-B-cell growth-stimulating factor/stromal cell-derived factor 1 receptor, a murine homolog of the human immunodeficiency virus 1 entry coreceptor fusin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 14726-14729 (1996).
- 192 Ara, T. *et al.* Impaired colonization of the gonads by primordial germ cells in mice lacking a chemokine, stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 5319-5323, doi:10.1073/pnas.0730719100 (2003).
- 193 Egawa, T. *et al.* The earliest stages of B cell development require a chemokine stromal cell-derived factor/pre-B cell growth-stimulating factor. *Immunity* **15**, 323-334 (2001).
- 194 Kawabata, K. *et al.* A cell-autonomous requirement for CXCR4 in long-term lymphoid and myeloid reconstitution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 5663-5667 (1999).
- 195 Hartmann, T. N. *et al.* A crosstalk between intracellular CXCR7 and CXCR4 involved in rapid CXCL12-triggered integrin activation but not in chemokine-triggered motility of human T lymphocytes and CD34+ cells.

- Journal of leukocyte biology* **84**, 1130-1140, doi:10.1189/jlb.0208088 (2008).
- 196 Luker, K. E. *et al.* Scavenging of CXCL12 by CXCR7 promotes tumor growth and metastasis of CXCR4-positive breast cancer cells. *Oncogene* **31**, 4750-4758, doi:10.1038/onc.2011.633 (2012).
- 197 Boldajipour, B. *et al.* Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration. *Cell* **132**, 463-473, doi:10.1016/j.cell.2007.12.034 (2008).
- 198 Sierro, F. *et al.* Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 14759-14764, doi:10.1073/pnas.0702229104 (2007).
- 199 Graham, G. J., Locati, M., Mantovani, A., Rot, A. & Thelen, M. The biochemistry and biology of the atypical chemokine receptors. *Immunology letters* **145**, 30-38, doi:10.1016/j.imlet.2012.04.004 (2012).
- 200 Maksym, R. B. *et al.* The role of stromal-derived factor-1--CXCR7 axis in development and cancer. *European journal of pharmacology* **625**, 31-40, doi:10.1016/j.ejphar.2009.04.071 (2009).
- 201 Odemis, V. *et al.* The presumed atypical chemokine receptor CXCR7 signals through G(i/o) proteins in primary rodent astrocytes and human glioma cells. *Glia* **60**, 372-381, doi:10.1002/glia.22271 (2012).
- 202 Heasman, S. J. & Ridley, A. J. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nature reviews. Molecular cell biology* **9**, 690-701, doi:10.1038/nrm2476 (2008).
- 203 Rossman, K. L., Der, C. J. & Sondek, J. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nature reviews. Molecular cell biology* **6**, 167-180, doi:10.1038/nrm1587 (2005).
- 204 Tybulewicz, V. L. & Henderson, R. B. Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes. *Nature reviews. Immunology* **9**, 630-644, doi:10.1038/nri2606 (2009).
- 205 Etienne-Manneville, S. & Hall, A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629-635, doi:10.1038/nature01148 (2002).
- 206 Wherlock, M. & Mellor, H. The Rho GTPase family: a Racs to Wrchs story. *Journal of cell science* **115**, 239-240 (2002).
- 207 Burridge, K. & Wennerberg, K. Rho and Rac take center stage. *Cell* **116**, 167-179 (2004).
- 208 Schmidt, A. & Hall, A. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes & development* **16**, 1587-1609, doi:10.1101/gad.1003302 (2002).
- 209 Dumont, C. *et al.* Rac GTPases play critical roles in early T-cell development. *Blood* **113**, 3990-3998, doi:10.1182/blood-2008-09-181180 (2009).
- 210 Vicente-Manzanares, M., Koach, M. A., Whitmore, L., Lamers, M. L. & Horwitz, A. F. Segregation and activation of myosin IIB creates a rear in migrating cells. *The Journal of cell biology* **183**, 543-554, doi:10.1083/jcb.200806030 (2008).
- 211 Kumar, A. *et al.* PAK thread from amoeba to mammals. *Journal of cellular biochemistry* **107**, 579-585, doi:10.1002/jcb.22159 (2009).
- 212 Guo, F., Debidda, M., Yang, L., Williams, D. A. & Zheng, Y. Genetic deletion of Rac1 GTPase reveals its critical role in actin stress fiber formation and focal

- adhesion complex assembly. *The Journal of biological chemistry* **281**, 18652-18659, doi:10.1074/jbc.M603508200 (2006).
- 213 Fukui, Y. *et al.* Haematopoietic cell-specific CDM family protein DOCK2 is essential for lymphocyte migration. *Nature* **412**, 826-831, doi:10.1038/35090591 (2001).
- 214 Braga, V. M. Cell-cell adhesion and signalling. *Current opinion in cell biology* **14**, 546-556 (2002).
- 215 Cook, D. R., Rossman, K. L. & Der, C. J. Rho guanine nucleotide exchange factors: regulators of Rho GTPase activity in development and disease. *Oncogene* **33**, 4021-4035, doi:10.1038/onc.2013.362 (2014).
- 216 Schmidt, A. & Hall, A. The Rho exchange factor Net1 is regulated by nuclear sequestration. *The Journal of biological chemistry* **277**, 14581-14588, doi:10.1074/jbc.M111108200 (2002).
- 217 Bustelo, X. R. The VAV family of signal transduction molecules. *Critical reviews in oncogenesis* **7**, 65-88 (1996).
- 218 Bartolome, R. A. *et al.* Activation of Vav/Rho GTPase signaling by CXCL12 controls membrane-type matrix metalloproteinase-dependent melanoma cell invasion. *Cancer research* **66**, 248-258, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2489 (2006).
- 219 Movilla, N. & Bustelo, X. R. Biological and regulatory properties of Vav-3, a new member of the Vav family of oncoproteins. *Mol Cell Biol* **19**, 7870-7885 (1999).
- 220 Tybulewicz, V. L. Vav-family proteins in T-cell signalling. *Current opinion in immunology* **17**, 267-274, doi:10.1016/j.coi.2005.04.003 (2005).
- 221 Bustelo, X. R. Regulatory and signaling properties of the Vav family. *Mol Cell Biol* **20**, 1461-1477 (2000).
- 222 Zugaza, J. L. *et al.* Structural determinants for the biological activity of Vav proteins. *The Journal of biological chemistry* **277**, 45377-45392, doi:10.1074/jbc.M208039200 (2002).
- 223 Turner, M. & Billadeau, D. D. VAV proteins as signal integrators for multi-subunit immune-recognition receptors. *Nature reviews. Immunology* **2**, 476-486, doi:10.1038/nri840 (2002).
- 224 Schuebel, K. E., Movilla, N., Rosa, J. L. & Bustelo, X. R. Phosphorylation-dependent and constitutive activation of Rho proteins by wild-type and oncogenic Vav-2. *The EMBO journal* **17**, 6608-6621, doi:10.1093/emboj/17.22.6608 (1998).
- 225 Aghazadeh, B., Lowry, W. E., Huang, X. Y. & Rosen, M. K. Structural basis for relief of autoinhibition of the Dbl homology domain of proto-oncogene Vav by tyrosine phosphorylation. *Cell* **102**, 625-633 (2000).
- 226 Bustelo, X. R. & Barbacid, M. Tyrosine phosphorylation of the vav proto-oncogene product in activated B cells. *Science* **256**, 1196-1199 (1992).
- 227 Reynolds, L. F. *et al.* Vav1 transduces T cell receptor signals to the activation of phospholipase C-gamma1 via phosphoinositide 3-kinase-dependent and -independent pathways. *The Journal of experimental medicine* **195**, 1103-1114 (2002).
- 228 Tybulewicz, V. L., Ardouin, L., Prisco, A. & Reynolds, L. F. Vav1: a key signal transducer downstream of the TCR. *Immunological reviews* **192**, 42-52 (2003).

- 229 Koretzky, G. A., Abtahian, F. & Silverman, M. A. SLP76 and SLP65: complex regulation of signalling in lymphocytes and beyond. *Nature reviews. Immunology* **6**, 67-78, doi:10.1038/nri1750 (2006).
- 230 Clements, J. L. Known and potential functions for the SLP-76 adapter protein in regulating T-cell activation and development. *Immunological reviews* **191**, 211-219 (2003).
- 231 Su, Y. W. *et al.* Interaction of SLP adaptors with the SH2 domain of Tec family kinases. *European journal of immunology* **29**, 3702-3711, doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199911)29:11<3702::AID-IMMU3702>3.0.CO;2-R (1999).
- 232 Jumaa, H. *et al.* Abnormal development and function of B lymphocytes in mice deficient for the signaling adaptor protein SLP-65. *Immunity* **11**, 547-554 (1999).
- 233 Wu, G. F. *et al.* Conditional deletion of SLP-76 in mature T cells abrogates peripheral immune responses. *European journal of immunology* **41**, 2064-2073, doi:10.1002/eji.201040809 (2011).
- 234 Motto, D. G., Ross, S. E., Wu, J., Hendricks-Taylor, L. R. & Koretzky, G. A. Implication of the GRB2-associated phosphoprotein SLP-76 in T cell receptor-mediated interleukin 2 production. *The Journal of experimental medicine* **183**, 1937-1943 (1996).
- 235 Jackman, J. K. *et al.* Molecular cloning of SLP-76, a 76-kDa tyrosine phosphoprotein associated with Grb2 in T cells. *The Journal of biological chemistry* **270**, 7029-7032 (1995).
- 236 Reif, K., Buday, L., Downward, J. & Cantrell, D. A. SH3 domains of the adapter molecule Grb2 complex with two proteins in T cells: the guanine nucleotide exchange protein Sos and a 75-kDa protein that is a substrate for T cell antigen receptor-activated tyrosine kinases. *The Journal of biological chemistry* **269**, 14081-14087 (1994).
- 237 Zamoyska, R. *et al.* The influence of the src-family kinases, Lck and Fyn, on T cell differentiation, survival and activation. *Immunological reviews* **191**, 107-118 (2003).
- 238 Wardenburg, J. B. *et al.* Phosphorylation of SLP-76 by the ZAP-70 Protein-tyrosine Kinase Is Required for T-cell Receptor Function. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 19641-19644, doi:10.1074/jbc.271.33.19641 (1996).
- 239 Wu, J. N., Jordan, M. S., Silverman, M. A., Peterson, E. J. & Koretzky, G. A. Differential requirement for adapter proteins Src homology 2 domain-containing leukocyte phosphoprotein of 76 kDa and adhesion- and degranulation-promoting adapter protein in FcepsilonRI signaling and mast cell function. *Journal of immunology* **172**, 6768-6774 (2004).
- 240 Raab, M., da Silva, A. J., Findell, P. R. & Rudd, C. E. Regulation of Vav-SLP-76 binding by ZAP-70 and its relevance to TCR zeta/CD3 induction of interleukin-2. *Immunity* **6**, 155-164 (1997).
- 241 Wu, J., Motto, D. G., Koretzky, G. A. & Weiss, A. Vav and SLP-76 interact and functionally cooperate in IL-2 gene activation. *Immunity* **4**, 593-602 (1996).
- 242 Onodera, H., Motto, D. G., Koretzky, G. A. & Rothstein, D. M. Differential regulation of activation-induced tyrosine phosphorylation and recruitment of SLP-76 to Vav by distinct isoforms of the CD45 protein-tyrosine phosphatase. *The Journal of biological chemistry* **271**, 22225-22230 (1996).

- 243 Wunderlich, L., Farago, A., Downward, J. & Buday, L. Association of Nck with tyrosine-phosphorylated SLP-76 in activated T lymphocytes. *European journal of immunology* **29**, 1068-1075, doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199904)29:04<1068::AID-IMMU1068>3.0.CO;2-P (1999).
- 244 Bunnell, S. C. *et al.* Biochemical interactions integrating Itk with the T cell receptor-initiated signaling cascade. *The Journal of biological chemistry* **275**, 2219-2230 (2000).
- 245 Clements, J. L. *et al.* Requirement for the leukocyte-specific adapter protein SLP-76 for normal T cell development. *Science* **281**, 416-419 (1998).
- 246 Pivniouk, V. *et al.* Impaired viability and profound block in thymocyte development in mice lacking the adaptor protein SLP-76. *Cell* **94**, 229-238 (1998).
- 247 Kumar, L., Pivniouk, V., de la Fuente, M. A., Laouini, D. & Geha, R. S. Differential role of SLP-76 domains in T cell development and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 884-889, doi:10.1073/pnas.022619199 (2002).
- 248 Jordan, M. S. *et al.* Complementation in trans of altered thymocyte development in mice expressing mutant forms of the adaptor molecule SLP76. *Immunity* **28**, 359-369, doi:10.1016/j.immuni.2008.01.010 (2008).
- 249 Liu, Q. *et al.* Structural basis for specific binding of the Gads SH3 domain to an RxxK motif-containing SLP-76 peptide: a novel mode of peptide recognition. *Molecular cell* **11**, 471-481 (2003).
- 250 Singer, A. L. *et al.* Roles of the proline-rich domain in SLP-76 subcellular localization and T cell function. *The Journal of biological chemistry* **279**, 15481-15490, doi:10.1074/jbc.M313339200 (2004).
- 251 Sauer, K. *et al.* Hematopoietic progenitor kinase 1 associates physically and functionally with the adaptor proteins B cell linker protein and SLP-76 in lymphocytes. *The Journal of biological chemistry* **276**, 45207-45216, doi:10.1074/jbc.M106811200 (2001).
- 252 Coppolino, M. G. *et al.* Evidence for a molecular complex consisting of Fyb/SLAP, SLP-76, Nck, VASP and WASP that links the actin cytoskeleton to Fcgamma receptor signalling during phagocytosis. *Journal of cell science* **114**, 4307-4318 (2001).
- 253 Burns, J. C. *et al.* The SLP-76 Src homology 2 domain is required for T cell development and activation. *Journal of immunology* **187**, 4459-4466, doi:10.4049/jimmunol.0903379 (2011).
- 254 Maltzman, J. S., Kovoov, L., Clements, J. L. & Koretzky, G. A. Conditional deletion reveals a cell-autonomous requirement of SLP-76 for thymocyte selection. *The Journal of experimental medicine* **202**, 893-900, doi:10.1084/jem.20051128 (2005).
- 255 Abtahian, F. *et al.* Regulation of blood and lymphatic vascular separation by signaling proteins SLP-76 and Syk. *Science* **299**, 247-251, doi:10.1126/science.1079477 (2003).
- 256 Kettner, A. *et al.* Structural Requirements of SLP-76 in Signaling via the High-Affinity Immunoglobulin E Receptor (Fc RI) in Mast Cells. *Molecular and Cellular Biology* **23**, 2395-2406, doi:10.1128/mcb.23.7.2395-2406.2003 (2003).

- 257 Obergfell, A. *et al.* The molecular adapter SLP-76 relays signals from platelet integrin α IIb β 3 to the actin cytoskeleton. *The Journal of biological chemistry* **276**, 5916-5923, doi:10.1074/jbc.M010639200 (2001).
- 258 Bonilla, F. A., Fujita, R. M., Pivniouk, V. I., Chan, A. C. & Geha, R. S. Adapter proteins SLP-76 and BLNK both are expressed by murine macrophages and are linked to signaling via Fc γ receptors I and II/III. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 1725-1730, doi:10.1073/pnas.040543597 (2000).
- 259 Myung, P. S. *et al.* In vitro and in vivo macrophage function can occur independently of SLP-76. *International immunology* **12**, 887-897 (2000).
- 260 Kremer, K. N., Humphreys, T. D., Kumar, A., Qian, N. X. & Hedin, K. E. Distinct Role of ZAP-70 and Src Homology 2 Domain-Containing Leukocyte Protein of 76 kDa in the Prolonged Activation of Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase by the Stromal Cell-Derived Factor-1 /CXCL12 Chemokine. *The Journal of Immunology* **171**, 360-367, doi:10.4049/jimmunol.171.1.360 (2003).
- 261 Ottoson, N. C., Pribila, J. T., Chan, A. S. H. & Shimizu, Y. Cutting Edge: T Cell Migration Regulated by CXCR4 Chemokine Receptor Signaling to ZAP-70 Tyrosine Kinase. *The Journal of Immunology* **167**, 1857-1861, doi:10.4049/jimmunol.167.4.1857 (2001).
- 262 Hunter, A. J., Ottoson, N., Boerth, N., Koretzky, G. A. & Shimizu, Y. Cutting Edge: A Novel Function for the SLAP-130/FYB Adapter Protein in 1 Integrin Signaling and T Lymphocyte Migration. *The Journal of Immunology* **164**, 1143-1147, doi:10.4049/jimmunol.164.3.1143 (2000).
- 263 Nguyen, K., Sylvain, N. R. & Bunnell, S. C. T cell costimulation via the integrin VLA-4 inhibits the actin-dependent centralization of signaling microclusters containing the adaptor SLP-76. *Immunity* **28**, 810-821, doi:10.1016/j.immuni.2008.04.019 (2008).
- 264 Horn, J. *et al.* Src homology 2-domain containing leukocyte-specific phosphoprotein of 76 kDa is mandatory for TCR-mediated inside-out signaling, but dispensable for CXCR4-mediated LFA-1 activation, adhesion, and migration of T cells. *Journal of immunology* **183**, 5756-5767, doi:10.4049/jimmunol.0900649 (2009).
- 265 Dracup, K. *et al.* A randomized clinical trial to reduce patient prehospital delay to treatment in acute coronary syndrome. *Circulation. Cardiovascular quality and outcomes* **2**, 524-532, doi:10.1161/CIRCOUTCOMES.109.852608 (2009).
- 266 Pauker, M. H., Reicher, B., Fried, S., Perl, O. & Barda-Saad, M. Functional cooperation between the proteins Nck and ADAP is fundamental for actin reorganization. *Mol Cell Biol* **31**, 2653-2666, doi:10.1128/MCB.01358-10 (2011).
- 267 Musci, M. A. *et al.* Molecular cloning of SLAP-130, an SLP-76-associated substrate of the T cell antigen receptor-stimulated protein tyrosine kinases. *The Journal of biological chemistry* **272**, 11674-11677 (1997).
- 268 Veale, M. *et al.* Novel Isoform of Lymphoid Adaptor FYN-T-binding Protein (FYB-130) Interacts with SLP-76 and Up-regulates Interleukin 2 Production. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 28427-28435, doi:10.1074/jbc.274.40.28427 (1999).

- 269 Dlužniewska, J., Zou, L., Harmon, I. R., Ellingson, M. T. & Peterson, E. J. Immature hematopoietic cells display selective requirements for adhesion- and degranulation-promoting adaptor protein in development and homeostasis. *European journal of immunology* **37**, 3208-3219, doi:10.1002/eji.200737094 (2007).
- 270 Griffiths, E. K. & Penninger, J. M. Communication between the TCR and integrins: role of the molecular adapter ADAP/Fyb/Slap. *Current opinion in immunology* **14**, 317-322 (2002).
- 271 Krause, M. *et al.* Fyn-binding protein (Fyb)/SLP-76-associated protein (SLAP), Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) proteins and the Arp2/3 complex link T cell receptor (TCR) signaling to the actin cytoskeleton. *The Journal of cell biology* **149**, 181-194 (2000).
- 272 Peterson, E. J. *et al.* Coupling of the TCR to integrin activation by Slap-130/Fyb. *Science* **293**, 2263-2265, doi:10.1126/science.1063486 (2001).
- 273 Wang, H., Wei, B., Bismuth, G. & Rudd, C. E. SLP-76-ADAP adaptor module regulates LFA-1 mediated costimulation and T cell motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 12436-12441, doi:10.1073/pnas.0900510106 (2009).
- 274 Kasirer-Friede, A. *et al.* ADAP interactions with talin and kindlin promote platelet integrin α IIb β 3 activation and stable fibrinogen binding. *Blood* **123**, 3156-3165, doi:10.1182/blood-2013-08-520627 (2014).
- 275 Wang, H. *et al.* Functional defects of SKAP-55-deficient T cells identify a regulatory role for the adaptor in LFA-1 adhesion. *Mol Cell Biol* **27**, 6863-6875, doi:10.1128/MCB.00556-07 (2007).
- 276 Wang, H. *et al.* SKAP-55 regulates integrin adhesion and formation of T cell-APC conjugates. *Nature immunology* **4**, 366-374, doi:10.1038/ni913 (2003).
- 277 Huang, Y. *et al.* Deficiency of ADAP/Fyb/SLAP-130 destabilizes SKAP55 in Jurkat T cells. *The Journal of biological chemistry* **280**, 23576-23583, doi:10.1074/jbc.M413201200 (2005).
- 278 Kliche, S. *et al.* The ADAP/SKAP55 signaling module regulates T-cell receptor-mediated integrin activation through plasma membrane targeting of Rap1. *Mol Cell Biol* **26**, 7130-7144, doi:10.1128/MCB.00331-06 (2006).
- 279 Menasche, G. *et al.* RIAM links the ADAP/SKAP-55 signaling module to Rap1, facilitating T-cell-receptor-mediated integrin activation. *Mol Cell Biol* **27**, 4070-4081, doi:10.1128/MCB.02011-06 (2007).
- 280 Duke-Cohan, J. S., Kang, H., Liu, H. & Rudd, C. E. Regulation and function of SKAP-55 non-canonical motif binding to the SH3c domain of adhesion and degranulation-promoting adaptor protein. *The Journal of biological chemistry* **281**, 13743-13750, doi:10.1074/jbc.M508774200 (2006).
- 281 Togni, M. *et al.* Regulation of in vitro and in vivo immune functions by the cytosolic adaptor protein SKAP-HOM. *Mol Cell Biol* **25**, 8052-8063, doi:10.1128/MCB.25.18.8052-8063.2005 (2005).
- 282 Raab, M. *et al.* T cell receptor "inside-out" pathway via signaling module SKAP1-RapL regulates T cell motility and interactions in lymph nodes. *Immunity* **32**, 541-556, doi:10.1016/j.immuni.2010.03.007 (2010).
- 283 Kang, H. *et al.* SH3 domain recognition of a proline-independent tyrosine-based RKxxYxxY motif in immune cell adaptor SKAP55. *The EMBO journal* **19**, 2889-2899, doi:10.1093/emboj/19.12.2889 (2000).

- 284 Balabanian, K. *et al.* The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *The Journal of biological chemistry* **280**, 35760-35766, doi:10.1074/jbc.M508234200 (2005).
- 285 Ophir, M. J., Liu, B. C. & Bunnell, S. C. The N terminus of SKAP55 enables T cell adhesion to TCR and integrin ligands via distinct mechanisms. *The Journal of cell biology* **203**, 1021-1041, doi:10.1083/jcb.201305088 (2013).
- 286 Marie-Cardine, A. *et al.* Molecular interaction between the Fyn-associated protein SKAP55 and the SLP-76-associated phosphoprotein SLAP-130. *The Journal of biological chemistry* **273**, 25789-25795 (1998).
- 287 Kliche, S. *et al.* CCR7-mediated LFA-1 functions in T cells are regulated by 2 independent ADAP/SKAP55 modules. *Blood* **119**, 777-785, doi:10.1182/blood-2011-06-362269 (2012).
- 288 Schraven, B., Marie-Cardine, A. & Koretzky, G. Molecular analysis of the fyn-complex: cloning of SKAP55 and SLAP-130, two novel adaptor proteins which associate with fyn and may participate in the regulation of T cell receptor-mediated signaling. *Immunology letters* **57**, 165-169 (1997).
- 289 Wang, H., Lu, Y. & Rudd, C. E. SKAP1 is dispensable for chemokine-induced migration of primary T-cells. *Immunology letters* **128**, 148-153, doi:10.1016/j.imlet.2009.10.010 (2010).
- 290 Ticchioni, M. *et al.* Signaling through ZAP-70 is required for CXCL12-mediated T-cell transendothelial migration. *Blood* **99**, 3111-3118 (2002).
- 291 Mould, A. P. *et al.* Integrin alpha 4 beta 1-mediated melanoma cell adhesion and migration on vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and the alternatively spliced IIICS region of fibronectin. *The Journal of biological chemistry* **269**, 27224-27230 (1994).
- 292 Achahbar, A., Alonso, J. J. & Munoz, M. A. Simple nonequilibrium extension of the Ising model. *Physical review. E, Statistical physics, plasmas, fluids, and related interdisciplinary topics* **54**, 4838-4843 (1996).
- 293 Aizman, A., Stein, J. D. & Stenson, S. M. A survey of patterns of physician hygiene in ophthalmology clinic patient encounters. *Eye & contact lens* **29**, 221-222, doi:10.1097/01.icl.0000086491.69934.94 (2003).
- 294 Tuosto, L., Michel, F. & Acuto, O. p95vav associates with tyrosine-phosphorylated SLP-76 in antigen-stimulated T cells. *The Journal of experimental medicine* **184**, 1161-1166 (1996).
- 295 Geng, L., Raab, M. & Rudd, C. E. Cutting edge: SLP-76 cooperativity with FYB/FYN-T in the Up-regulation of TCR-driven IL-2 transcription requires SLP-76 binding to FYB at Tyr595 and Tyr651. *Journal of immunology* **163**, 5753-5757 (1999).
- 296 Boerth, N. J., Judd, B. A. & Koretzky, G. A. Functional association between SLAP-130 and SLP-76 in Jurkat T cells. *The Journal of biological chemistry* **275**, 5143-5152 (2000).
- 297 Fischer, K. D. *et al.* Vav is a regulator of cytoskeletal reorganization mediated by the T-cell receptor. *Current biology: CB* **8**, 554-562 (1998).
- 298 Feigelson, S. W. *et al.* The Src kinase p56(lck) up-regulates VLA-4 integrin affinity. Implications for rapid spontaneous and chemokine-triggered T cell adhesion to VCAM-1 and fibronectin. *The Journal of biological chemistry* **276**, 13891-13901, doi:10.1074/jbc.M004939200 (2001).

- 299 Gonzalez-Alvaro, I. *et al.* Interference of nonsteroidal antiinflammatory drugs with very late activation antigen 4/vascular cells adhesion molecule 1-mediated lymphocyte-endothelial cell adhesion. *Arthritis and rheumatism* **41**, 1677-1688, doi:10.1002/1529-0131(199809)41:9<1677::AID-ART20>3.0.CO;2-4 (1998).
- 300 Avraham, H., Park, S. Y., Schinkmann, K. & Avraham, S. RAFTK/Pyk2-mediated cellular signalling. *Cellular signalling* **12**, 123-133 (2000).
- 301 Schaller, M. D. Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions. *Journal of cell science* **123**, 1007-1013, doi:10.1242/jcs.045112 (2010).
- 302 Gismondi, A. *et al.* Proline-rich tyrosine kinase 2 and Rac activation by chemokine and integrin receptors controls NK cell transendothelial migration. *Journal of immunology* **170**, 3065-3073 (2003).
- 303 Shi, C. S., Sinnarajah, S., Cho, H., Kozasa, T. & Kehrl, J. H. G13alpha-mediated PYK2 activation. PYK2 is a mediator of G13alpha -induced serum response element-dependent transcription. *The Journal of biological chemistry* **275**, 24470-24476, doi:10.1074/jbc.M908449199 (2000).
- 304 Okabe, S. *et al.* Stromal cell-derived factor-1alpha/CXCL12-induced chemotaxis of T cells involves activation of the RasGAP-associated docking protein p62Dok-1. *Blood* **105**, 474-480, doi:10.1182/blood-2004-03-0843 (2005).
- 305 Gao, C. & Blystone, S. D. A Pyk2-Vav1 complex is recruited to beta3-adhesion sites to initiate Rho activation. *The Biochemical journal* **420**, 49-56, doi:10.1042/BJ20090037 (2009).
- 306 Okigaki, M. *et al.* Pyk2 regulates multiple signaling events crucial for macrophage morphology and migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 10740-10745, doi:10.1073/pnas.1834348100 (2003).
- 307 Guinamard, R., Okigaki, M., Schlessinger, J. & Ravetch, J. V. Absence of marginal zone B cells in Pyk-2-deficient mice defines their role in the humoral response. *Nature immunology* **1**, 31-36, doi:10.1038/76882 (2000).
- 308 Avraham, S. & Avraham, H. Characterization of the novel focal adhesion kinase RAFTK in hematopoietic cells. *Leukemia & lymphoma* **27**, 247-256, doi:10.3109/10428199709059681 (1997).
- 309 Dikic, I., Dikic, I. & Schlessinger, J. Identification of a new Pyk2 isoform implicated in chemokine and antigen receptor signaling. *The Journal of biological chemistry* **273**, 14301-14308 (1998).
- 310 Leung, T., Chen, X. Q., Manser, E. & Lim, L. The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Mol Cell Biol* **16**, 5313-5327 (1996).
- 311 Ridley, A. J. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends in cell biology* **16**, 522-529, doi:10.1016/j.tcb.2006.08.006 (2006).
- 312 Chang, Y. P., Pinaud, F., Antelman, J. & Weiss, S. Tracking bio-molecules in live cells using quantum dots. *Journal of biophotonics* **1**, 287-298, doi:10.1002/jbio.200810029 (2008).

- 313 Thompson, R. E., Larson, D. R. & Webb, W. W. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophysical journal* **82**, 2775-2783, doi:10.1016/S0006-3495(02)75618-X (2002).
- 314 Cherry, R. J. Keeping track of cell surface receptor. *Trends in cell biology* **2**, 242-244 (1992).
- 315 Saxton, M. J. & Jacobson, K. Single-particle tracking: applications to membrane dynamics. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **26**, 373-399, doi:10.1146/annurev.biophys.26.1.373 (1997).
- 316 Kusumi, A. *et al.* Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **34**, 351-378, doi:10.1146/annurev.biophys.34.040204.144637 (2005).
- 317 Pinaud, F. *et al.* Dynamic partitioning of a glycosyl-phosphatidylinositol-anchored protein in glycosphingolipid-rich microdomains imaged by single-quantum dot tracking. *Traffic* **10**, 691-712, doi:10.1111/j.1600-0854.2009.00902.x (2009).
- 318 Barroso, M. M. Quantum dots in cell biology. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **59**, 237-251, doi:10.1369/0022155411398487 (2011).
- 319 Klar, T. A., Jakobs, S., Dyba, M., Egner, A. & Hell, S. W. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 8206-8210 (2000).
- 320 Garcia-Bernal, D. *et al.* DOCK2 is required for chemokine-promoted human T lymphocyte adhesion under shear stress mediated by the integrin alpha4beta1. *Journal of immunology* **177**, 5215-5225 (2006).
- 321 Barda-Saad, M. *et al.* Cooperative interactions at the SLP-76 complex are critical for actin polymerization. *The EMBO journal* **29**, 2315-2328, doi:10.1038/emboj.2010.133 (2010).
- 322 Bubeck Wardenburg, J. *et al.* Regulation of PAK activation and the T cell cytoskeleton by the linker protein SLP-76. *Immunity* **9**, 607-616 (1998).
- 323 Wang, H. *et al.* ZAP-70: an essential kinase in T-cell signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**, a002279, doi:10.1101/cshperspect.a002279 (2010).
- 324 Huang, J., Tilly, D., Altman, A., Sugie, K. & Grey, H. M. T-cell receptor antagonists induce Vav phosphorylation by selective activation of Fyn kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 10923-10929 (2000).
- 325 Siliceo, M. *et al.* Beta2-chimaerin provides a diacylglycerol-dependent mechanism for regulation of adhesion and chemotaxis of T cells. *Journal of cell science* **119**, 141-152, doi:10.1242/jcs.02722 (2006).
- 326 Seoh, M. L., Ng, C. H., Yong, J., Lim, L. & Leung, T. ArhGAP15, a novel human RacGAP protein with GTPase binding property. *FEBS letters* **539**, 131-137 (2003).
- 327 Phee, H., Abraham, R. T. & Weiss, A. Dynamic recruitment of PAK1 to the immunological synapse is mediated by PIX independently of SLP-76 and Vav1. *Nature immunology* **6**, 608-617, doi:10.1038/ni1199 (2005).

- 328 Runne, C. & Chen, S. WD40-repeat proteins control the flow of Gbetagamma signaling for directional cell migration. *Cell adhesion & migration* **7**, 214-218, doi:10.4161/cam.22940 (2013).
- 329 McBeath, R., Pirone, D. M., Nelson, C. M., Bhadriraju, K. & Chen, C. S. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Developmental cell* **6**, 483-495 (2004).
- 330 Lafuente, E. M. *et al.* RIAM, an Ena/VASP and Profilin ligand, interacts with Rap1-GTP and mediates Rap1-induced adhesion. *Developmental cell* **7**, 585-595, doi:10.1016/j.devcel.2004.07.021 (2004).
- 331 Faurobert, E. *et al.* CCM1-ICAP-1 complex controls beta1 integrin-dependent endothelial contractility and fibronectin remodeling. *The Journal of cell biology* **202**, 545-561, doi:10.1083/jcb.201303044 (2013).
- 332 Lefort, C. T. *et al.* Distinct roles for talin-1 and kindlin-3 in LFA-1 extension and affinity regulation. *Blood* **119**, 4275-4282, doi:10.1182/blood-2011-08-373118 (2012).
- 333 Bouvard, D. & Block, M. R. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II controls integrin alpha5beta1-mediated cell adhesion through the integrin cytoplasmic domain associated protein-1alpha. *Biochemical and biophysical research communications* **252**, 46-50, doi:10.1006/bbrc.1998.9592 (1998).
- 334 Shimaoka, M. & Springer, T. A. Therapeutic antagonists and conformational regulation of integrin function. *Nature reviews. Drug discovery* **2**, 703-716, doi:10.1038/nrd1174 (2003).
- 335 Lu, C., Takagi, J. & Springer, T. A. Association of the membrane proximal regions of the alpha and beta subunit cytoplasmic domains constrains an integrin in the inactive state. *The Journal of biological chemistry* **276**, 14642-14648, doi:10.1074/jbc.M100600200 (2001).
- 336 Bakker, G. J. *et al.* Lateral mobility of individual integrin nanoclusters orchestrates the onset for leukocyte adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 4869-4874, doi:10.1073/pnas.1116425109 (2012).
- 337 Cairo, C. W., Mirchev, R. & Golan, D. E. Cytoskeletal regulation couples LFA-1 conformational changes to receptor lateral mobility and clustering. *Immunity* **25**, 297-308, doi:10.1016/j.immuni.2006.06.012 (2006).
- 338 Borgman, K. J. *et al.* Priming by chemokines restricts lateral mobility of the adhesion receptor LFA-1 and restores adhesion to ICAM-1 nano-aggregates on human mature dendritic cells. *PloS one* **9**, e99589, doi:10.1371/journal.pone.0099589 (2014).
- 339 Rossier, O. *et al.* Integrins beta1 and beta3 exhibit distinct dynamic nanoscale organizations inside focal adhesions. *Nature cell biology* **14**, 1057-1067, doi:10.1038/ncb2588 (2012).
- 340 Wu, X., Yu, T., Bullard, D. C. & Kucik, D. F. SDF-1alpha (CXCL12) regulation of lateral mobility contributes to activation of LFA-1 adhesion. *American journal of physiology. Cell physiology* **303**, C666-672, doi:10.1152/ajpcell.00190.2012 (2012).
- 341 Wegener, K. L. *et al.* Structural basis of integrin activation by talin. *Cell* **128**, 171-182, doi:10.1016/j.cell.2006.10.048 (2007).
- 342 Tadokoro, S. *et al.* Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science* **302**, 103-106, doi:10.1126/science.1086652 (2003).

- 343 Geiger, C. *et al.* Cytohesin-1 regulates beta-2 integrin-mediated adhesion through both ARF-GEF function and interaction with LFA-1. *The EMBO journal* **19**, 2525-2536, doi:10.1093/emboj/19.11.2525 (2000).
- 344 Smith, A. *et al.* A talin-dependent LFA-1 focal zone is formed by rapidly migrating T lymphocytes. *The Journal of cell biology* **170**, 141-151, doi:10.1083/jcb.200412032 (2005).
- 345 van Kooyk, Y. & Figdor, C. G. Avidity regulation of integrins: the driving force in leukocyte adhesion. *Current opinion in cell biology* **12**, 542-547 (2000).
- 346 Alon, R. & Dustin, M. L. Force as a facilitator of integrin conformational changes during leukocyte arrest on blood vessels and antigen-presenting cells. *Immunity* **26**, 17-27, doi:10.1016/j.immuni.2007.01.002 (2007).
- 347 Kucik, D. F., Dustin, M. L., Miller, J. M. & Brown, E. J. Adhesion-activating phorbol ester increases the mobility of leukocyte integrin LFA-1 in cultured lymphocytes. *The Journal of clinical investigation* **97**, 2139-2144, doi:10.1172/JCI118651 (1996).
- 348 Lub, M., van Kooyk, Y., van Vliet, S. J. & Figdor, C. G. Dual role of the actin cytoskeleton in regulating cell adhesion mediated by the integrin lymphocyte function-associated molecule-1. *Molecular biology of the cell* **8**, 341-351 (1997).
- 349 van Buul, J. D. *et al.* ICAM-1 clustering on endothelial cells recruits VCAM-1. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2010**, 120328, doi:10.1155/2010/120328 (2010).

Anexos

Publicaciones del autor relacionadas con el trabajo de tesis:

- Ana Dios-Esponera*, **Soledad Isern de Val***, Silvia Sevilla-Movilla, Rosa García-Verdugo, David García-Bernal, Nohemí Arellano-Sánchez, Carlos Cabañas, and Joaquin Teixidó. Positive and negative regulation by SLP-76/ADAP and Pyk2 of chemokine-stimulated T-lymphocyte adhesion mediated by integrin $\alpha 4\beta 1$. 2015. Molecular Biology of the Cell. Vol. 26 nº. 18 3215-3228, 2015. **ANEXO I**
- Alberto Sosa-Costa*, **Soledad Isern de Val***, Carlo Manzo, Joaquín Teixidó, María García-Parajo. Magnified by chemokines, VCAM-1 in solution restricts lateral mobility and induces high affinity but not avidity of VLA-1 on T cells. En preparación.

Publicaciones en las que ha colaborado el autor:

- Mónica Martínez-Moreno*, Magdalena Leiva*, Noemí Aguilera-Montilla, Silvia Sevilla-Movilla, **Soledad Isern de Val**, Nohemí Arellano-Sánchez, Norma C. Gutiérrez, Roberto Maldonado, Joaquin Martínez-López, Ismael Buño, José A. García-Marco, Paloma Sánchez-Mateos, Andrés Hidalgo, Angeles García-Pardo and Joaquin Teixidó. *In vivo* adhesion of malignant B cells to bone marrow microvasculature is regulated by $\alpha 4\beta 1$ cytoplasmic-binding proteins. 2015. Aceptado. **ANEXO II**
- Rubén A. Bartolomé, Eva Calviño, **Soledad Isern de Val**, Irene García-Palmero, Sofía Torres, Javier S. Morales-Rojas, Beatriz Escudero-Paniagua, Rodrigo Barderas, Joaquin Teixidó and J. Ignacio Casal. VE-Cadherin RGD motifs promote metastatic behavior in melanoma and breast cáncer. En preparación.

Anexo I

Positive and negative regulation by SLP-76/ADAP and Pyk2 of chemokine-stimulated T-lymphocyte adhesion mediated by integrin $\alpha 4\beta 1$

Ana Dios-Esponera^{a,*†}, Soledad Isern de Val^{a,*}, Silvia Sevilla-Movilla^a, Rosa García-Verdugo^{a,‡}, David García-Bernal^{a,§}, Nohemí Arellano-Sánchez^a, Carlos Cabañas^b, and Joaquín Teixidó^a

^aCentro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Department of Cellular and Molecular Medicine, 28040 Madrid, Spain;

^bCentro de Biología Molecular (CSIC), Department of Cell Biology and Immunology, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

ABSTRACT Stimulation by chemokines of integrin $\alpha 4\beta 1$ -dependent T-lymphocyte adhesion is a crucial step for lymphocyte trafficking. The adaptor Vav1 is required for chemokine-activated T-cell adhesion mediated by $\alpha 4\beta 1$. Conceivably, proteins associating with Vav1 could potentially modulate this adhesion. Correlating with activation by the chemokine CXCL12 of T-lymphocyte attachment to $\alpha 4\beta 1$ ligands, a transient stimulation in the association of Vav1 with SLP-76, Pyk2, and ADAP was observed. Using T-cells depleted for SLP-76, ADAP, or Pyk2, or expressing Pyk2 kinase-inactive forms, we show that SLP-76 and ADAP stimulate chemokine-activated, $\alpha 4\beta 1$ -mediated adhesion, whereas Pyk2 opposes T-cell attachment. While CXCL12-promoted generation of high-affinity $\alpha 4\beta 1$ is independent of SLP-76, ADAP, and Pyk2, the strength of $\alpha 4\beta 1$ -VCAM-1 interaction and cell spreading on VCAM-1 are targets of regulation by these three proteins. GTPase assays, expression of activated or dominant-negative Rac1, or combined ADAP and Pyk2 silencing indicated that Rac1 activation by CXCL12 is a common mediator response in SLP-76-, ADAP-, and Pyk2-regulated cell adhesion involving $\alpha 4\beta 1$. Our data strongly suggest that chemokine-stimulated associations between Vav1, SLP-76, and ADAP facilitate Rac1 activation and $\alpha 4\beta 1$ -mediated adhesion, whereas Pyk2 opposes this adhesion by limiting Rac1 activation.

Monitoring Editor

Mark H. Ginsberg
University of California,
San Diego

Received: Jul 30, 2014

Revised: Jul 2, 2015

Accepted: Jul 13, 2015

INTRODUCTION

Trafficking of T-lymphocytes from blood circulation to lymphoid tissue and to sites of injury and infection depends on rapid and

transient activation of $\alpha L\beta 2$ and $\alpha 4\beta 1$ integrin function by chemokines located on the endothelium and inside tissues (Luster *et al.*, 2005; Ley *et al.*, 2007). Following the binding of chemokines to their receptors, an inside-out signaling that impinges on the cytoplasmic domains of integrins is generated (Thelen and Stein, 2008). The final consequence of this signaling is the generation of high-affinity extra-cellular $\alpha L\beta 2$ - and $\alpha 4\beta 1$ -integrin conformations that are competent for binding to their ligands ICAM-1 and VCAM-1, respectively, which are expressed on lymphoid or inflamed endothelium, and also facilitates $\alpha 4\beta 1$ interaction with the CS-1 region of tissue fibronectin.

While talin binding to cytoplasmic motifs on $\beta 1$ - and $\beta 2$ -integrin subunits represents a common and central event for transmission of inside-out signaling from chemokine receptors to generate active $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha L\beta 2$ (Moser *et al.*, 2009b; Hogg *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2011; Calderwood *et al.*, 2013), important differences exist in the molecular pattern of this signaling to either integrin. $\alpha L\beta 2$ -dependent leukocyte adhesion stimulated through inside-out signaling shows a crucial requirement for kindlin 3, another important β subunit-binding protein, and to a lesser extent for $\alpha 4\beta 1$ (Malinin *et al.*, 2009; Manevich-Mendelson *et al.*, 2009; Moser *et al.*, 2009a; Svensson

This article was published online ahead of print in MBoc in Press (<http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E14-07-1246>) on July 22, 2015.

*These authors equally contributed to this work.

Present addresses: [†]Center for Cancer Research, National Cancer Institute, Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Building 37, Room 2066, Bethesda, MD 20892; [‡]Max Planck Institute for Neurobiology, Am Klopferspitz 18, 82152 Martinsried, Germany; [§]Hematology Department, Virgen de la Arrixaca Clinical University Hospital, IMIB, University of Murcia, Ctra. Madrid-Cartagena, s/n 30120 Murcia, Spain.

Address correspondence to: Joaquín Teixidó (joaquin@ Cib.csic.es).

Abbreviations used: GAP, GTPase-activating protein; GEF, guanine nucleotide exchange factor; GFP, green fluorescent protein; IgG, immunoglobulin G; mAb, monoclonal antibody; PRNK, Pyk2-related nonkinase; PTx, pertussis toxin; siRNA, small interfering RNA; TCR, T-cell receptor.

© 2015 Dios-Esponera, Isern de Val, *et al.* This article is distributed by The American Society for Cell Biology under license from the author(s). Two months after publication it is available to the public under an Attribution–Noncommercial–Share Alike 3.0 Unported Creative Commons License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0>).

"ASCB®," "The American Society for Cell Biology®," and "Molecular Biology of the Cell®" are registered trademarks of The American Society for Cell Biology.

Supplemental Material can be found at:
<http://www.molbiolcell.org/content/suppl/2015/07/19/mbc.E14-07-1246v1.DC1.html>

Supplemental Materials

Molecular Biology of the Cell

Dios-Esponera et al.

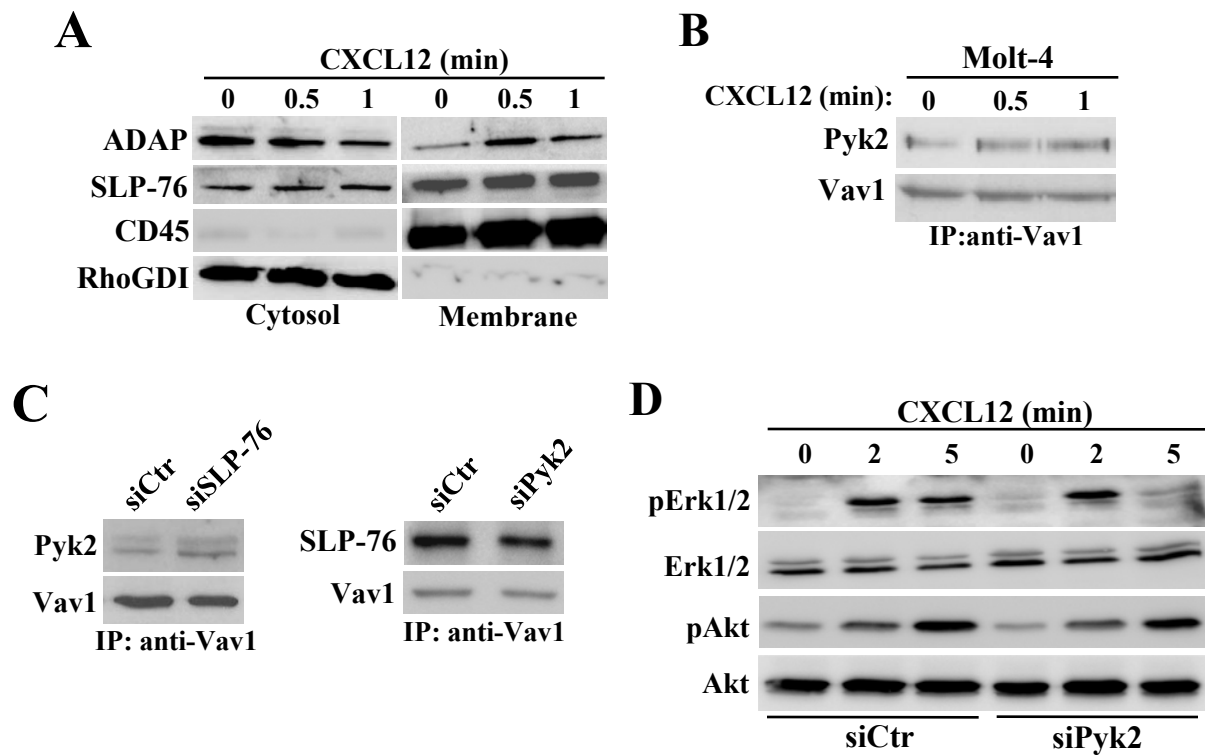


Fig. S1

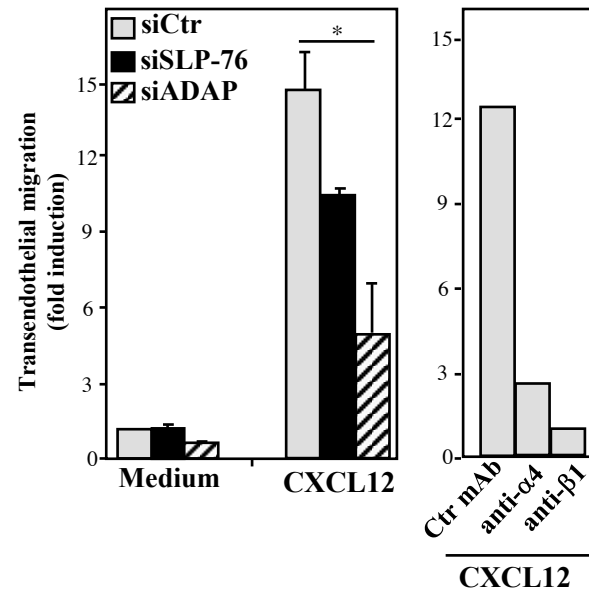
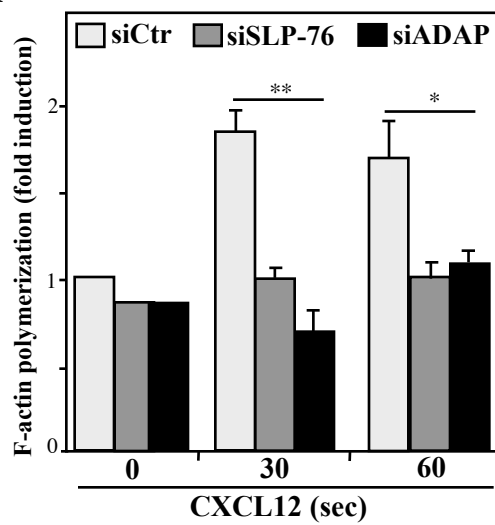
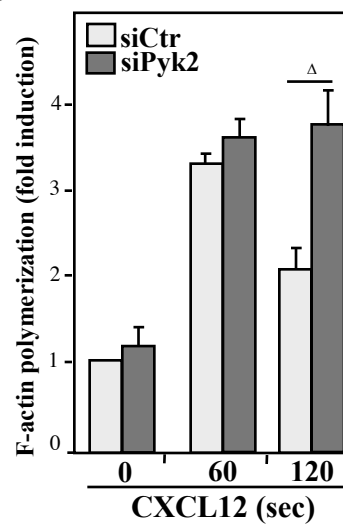


Fig. S2

A**B**

SUPPLEMENTAL MATERIALS

Figure S1. (A) Molt-4 cells were tested in cell fractionation assays, as described (Redondo-Munoz *et al.*, 2006). Briefly, following cell exposure to digitonin and subsequent centrifugation, pellet (membrane fraction) was extracted with NP-40 lysis buffer, whereas supernatants (cytosolic fraction) were clarified by centrifugation. Protein detection was performed by immunoblotting. RhoGDI (anti-RhoGDI, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), and CD45 (anti-CD45 RP2/21 mAb, a gift from Dr. Francisco Sánchez-Madrid, Hospital de la Princesa, Madrid, Spain) represent cytosolic and membrane markers, respectively. (B) Cells were incubated in the absence or presence of CXCL12, and subsequently subjected to immunoprecipitation and western blotting. (C) siRNA transfectants were subjected to immunoprecipitation with anti-Vav1 antibodies followed by immunoblotting with antibodies to the shown proteins. (D) Control or Pyk2 siRNA transfectants were exposed to CXCL12, and analyzed by immunoblotting with antibodies to phospho-Erk1/2, Erk1/2, phospho-Akt and Akt (Cell Signaling Technology, Danvers, MA).

Figure S2. Migration of Molt-4 siRNA transfectants across TNF- α -treated HUVEC monolayers. Cell migration was carried out as described (Parmo-Cabanas *et al.*, 2004), and migrated cells counted by flow cytometry. Inhibition of control siRNA transfectant migration by anti- α 4 and anti- β 1 antibodies is also shown. Migration was significantly inhibited in comparison with the migration of chemokine-stimulated control siRNA transfectants, * $p < 0.05$.

Figure S3. F-actin polymerization of Molt-4 siRNA transfectants. The indicated transfectants were exposed to CXCL12 and tested in F-actin polymerization assays. Cellular F-actin content was measured by flow cytometry following described protocols (Sanz-Rodriguez *et al.*, 2001).

REFERENCES

- Parmo-Cabanas, M., Bartolome, R.A., Wright, N., Hidalgo, A., Drager, A.M., and Teixido, J. (2004). Integrin α 4 β 1 involvement in stromal cell-derived factor-1 α -promoted myeloma cell transendothelial migration and adhesion: role of cAMP and the actin cytoskeleton in adhesion. *Exp Cell Res* **294**, 571-580.
- Redondo-Munoz, J., Escobar-Diaz, E., Samaniego, R., Terol, M.J., Garcia-Marco, J.A., and Garcia-Pardo, A. (2006). MMP-9 in B-cell chronic lymphocytic leukemia is up-regulated by α 4 β 1 integrin or CXCR4 engagement via distinct signaling pathways, localizes to podosomes, and is involved in cell invasion and migration. *Blood* **108**, 3143-3151.
- Sanz-Rodriguez, F., Hidalgo, A., and Teixido, J. (2001). Chemokine stromal cell-derived factor-1 α modulates VLA-4 integrin-mediated multiple myeloma cell adhesion to CS-1/fibronectin and VCAM-1. *Blood* **97**, 346-351.

Anexo II

ORIGINAL ARTICLE

In vivo adhesion of malignant B cells to bone marrow microvasculature is regulated by $\alpha 4\beta 1$ cytoplasmic-binding proteins

M Martínez-Moreno^{1,9}, M Leiva^{2,9}, N Aguilera-Montilla¹, S Sevilla-Movilla¹, S Isern de Val¹, N Arellano-Sánchez¹, NC Gutiérrez³, R Maldonado⁴, J Martínez-López⁴, I Buño⁵, JA García-Marco⁶, P Sánchez-Mateos⁷, A Hidalgo^{2,8}, A García-Pardo¹ and J Teixidó¹

Multiple myeloma (MM) and chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells must attach to the bone marrow (BM) microvasculature before lodging in the BM microenvironment. Using intravital microscopy (IVM) of the BM calvariae we demonstrate that the $\alpha 4\beta 1$ integrin is required for MM and CLL cell firm arrest onto the BM microvasculature, while endothelial P-selectin and E-selectin mediate cell rolling. Talin, kindlin-3 and ICAP-1 are $\beta 1$ -integrin-binding partners that regulate $\beta 1$ -mediated cell adhesion. We show that talin and kindlin-3 cooperatively stimulate high affinity and strength of $\alpha 4\beta 1$ -dependent MM and CLL cell attachment, whereas ICAP-1 negatively regulates this adhesion. A functional connection between talin/kindlin-3 and Rac1 was found to be required for MM cell attachment mediated by $\alpha 4\beta 1$. Importantly, IVM analyses with talin- and kindlin-3-silenced MM cells indicate that these proteins are needed for cell arrest on the BM microvasculature. Instead, MM cell arrest is repressed by ICAP-1. Moreover, MM cells silenced for talin and kindlin-3, and cultured on $\alpha 4\beta 1$ ligands showed higher susceptibility to bortezomib-mediated cell apoptosis. Our results highlight the requirement of $\alpha 4\beta 1$ and selectins for the *in vivo* attachment of MM and CLL cells to the BM microvasculature, and indicate that talin, kindlin-3 and ICAP-1 differentially control physiological adhesion by regulating $\alpha 4\beta 1$ activity.

Leukemia advance online publication, 8 January 2016; doi:10.1038/leu.2015.332

INTRODUCTION

Multiple myeloma (MM) and chronic lymphocytic leukemia (CLL) are B-cell neoplasms characterized by malignant cell trafficking to the bone marrow (BM).^{1–3} Myeloma cells accumulate in the BM, leading to bone destruction, anemia, serum monoclonal gammopathy and immune suppression,⁴ and their attachment to components of the BM microenvironment induces cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR).^{5,6} Widespread involvement of the BM and the presence of circulating MM cells in more than 70% of patients at diagnosis indicate that there is a continuous recirculation of MM cells in the peripheral blood and re-entrance to multiple areas in the BM niches.^{7,8} Homing of MM cells from the circulation into the BM milieu must begin with stepwise interactions with the BM microvasculature, involving rolling and firm attachment processes. The initial rolling step may potentially be mediated by selectins, and it was earlier shown that P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) contributes to the overall MM cell homing to the BM.⁹ *In vitro* data suggest that $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha L\beta 2$ integrins are relevant candidates to mediate the attachment of circulating MM cells to the BM microvasculature,^{10–14} but the *in vivo* contribution of these integrins has not yet been fully elucidated.

The $\alpha 4\beta 1$ integrin also has key roles in CLL cell *in vitro* migration and *in vivo* homing to BM and lymph nodes (LNs).^{15–20} $\alpha 4\beta 1$

expression is associated with the presence of lymphadenopathy in CLL patients,²¹ and it was recently shown to be the strongest predictor of overall survival in CLL.²² $\alpha L\beta 2$ displays aberrant chemokine-induced activation in CLL cells,^{23–25} and it also contributes to CLL cell *in vitro* migration.²¹ The role of $\alpha L\beta 2$ in CLL *in vivo* adhesion is less clear. As in MM, CLL cell interaction with the BM microenvironment provides survival signals and induces drug resistance, thus contributing to disease progression.^{26,27}

The $\alpha 4\beta 1$ activity is tightly regulated by inside-out signaling induced upon chemokine-receptor interactions.²⁸ In MM cells, the small GTPase Rac1 and its upstream activator DOCK2, as well as RhoA positively regulate this signaling in response to the chemokine CXCL12, leading to stimulation of $\alpha 4\beta 1$ -mediated cell adhesion.^{29,30} A key step in integrin activation in leukocytes is the binding of talin and the hematopoietic-specific kindlin-3 to the cytoplasmic domain of the integrin $\beta 1$ subunit.^{31–33} The talin N-terminal FERM (protein 4.1, ezrin, radixin and moesin) region binds to the membrane-proximal NPXY/F motif of β -subunit cytoplasmic tails. This causes the spatial separation of the α - and β -subunits and the extension of the integrin extracellular domain, leading to the generation of high-affinity integrins and upregulation of cell adhesion.^{31,33} Kindlin proteins also have a FERM

¹Department of Cellular and Molecular Medicine, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid, Spain; ²Area of Cell and Developmental Biology, Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid, Spain; ³Department of Hematology, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain; ⁴Section of Hematology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain; ⁵Section of Hematology, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, Spain; ⁶Hematology Unit, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid, Spain; ⁷Section of Immuno-Oncology, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Complutense University School of Medicine, Madrid, Spain and ⁸Institute for Cardiovascular Prevention, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany. Correspondence: Dr J Teixidó, Department of Cellular and Molecular Medicine, Centro de Investigaciones Biológicas, Ramiro de Maeztu 9, Madrid 28040, Spain. E-mail: joaquin@cib.csic.es

⁹These authors contributed equally to this work.

Received 11 June 2015; revised 23 October 2015; accepted 24 November 2015; accepted article preview online 10 December 2015